



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Mariana Bueno de Paula Nery

Identificação de bactérias oriundas da Antártica e investigação
do potencial antiviral.

CAMPINAS

2016

Mariana Bueno de Paula Nery

Identificação de bactérias oriundas da Antártica e investigação do potencial antiviral.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA Mariana Bueno de
Paula Nery E ORIENTADA PELA Dra. Fabiana
Fantinati Garboggini

Orientador: Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Co-Orientador: Dra. Luciana Konency Kohn

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 2013/05113-8; FAPESP, 2013/05961-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

D18i Damato, Mariana Bueno de Paula, 1988-
Identificação de bactérias oriundas da Antártica e investigação do potencial antiviral / Mariana Bueno de Paula Nery. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini.
Coorientador: Luciana Konecny Kohn.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Continente antártico. 2. Bactéria. 3. Atividade microbiana. 4. Extração líquido-líquido. 5. Agentes antivirais. I. Fantinatti Garboggini, Fabiana, 1965-. II. Kohn, Luciana Konecny. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of bacterial from Antarctic and investigation of antiviral potential

Palavras-chave em inglês:

Antarctic continent

Bacteria

Microbial activity

Liquid-liquid extraction

Antiviral agents

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabiana Fantinatti Garboggini

Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Vera Lúcia Garcia

Data de defesa: 04-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 04 de Fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Prof.(a). Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Prof.(a) Dra. Vera Lúcia Garcia

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini pela confiança, orientação, paciência, compreensão, doação de seu tempo e conhecimento. Todo o amadurecimento e aprendizagem que obtive ao longo desses anos juntas não seria possível se ela não tivesse sido exatamente quem ela é. Muito obrigada por tudo Fabi!!!

À Dra. Luciana Konecny Kohn pela co-orientação que acrescentou muito para minha aprendizagem sobre cultura de células. Aprendizagem que foi fundamental para a realização desse projeto.

À Dra. Clarice Weis Arns por ceder gentilmente a estrutura, espaço e equipe do Laboratório de Virologia Animal (LVA) para que fosse possível realizar os ensaios de atividade antiviral do projeto.

À Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano pela disponibilidade em participar e colaborar como membro da banca de exame de qualificação e defesa do meu mestrado. Participação essa fundamental para meu desenvolvimento profissional.

À Dra. Vera Lúcia Garcia pela disponibilidade em participar e colaborar como membro da banca de exame de qualificação e defesa do meu mestrado. Participação essa fundamental para meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues auxiliar na extração líquido-líquido dos extratos microbianos, por ceder seu tempo e espaço na Divisão de Química de Produtos Naturais.

Ao CPQBA e, principalmente, à DRM por todo o suporte estrutural e material necessário para o desenvolvimento desse projeto de mestrado.

À Unicamp e ao programa de Pós-graduação em Biologia e Genética Molecular, Instituto de Biologia. Agradeço também à Lourdes que me auxiliou em toda a jornada do início ao fim.

Aos meus pais, pois sem eles não saberia como e nem por onde começar a jornada da minha vida. Eles são minha alma.

Ao Cesar; meu noivo, futuro marido, namorado, amigo, companheiro, nem consigo encontrar palavras para descrevê-lo, só sei que é muito amor e amor dos bons e dos verdadeiros. Um amor que, infelizmente, poucos conhecem. Amor que divide coisas boas e coisas ruins, amor

que me acolheu em cada noite de dor, de angústia e de medo dos desafios desse Mestrado e de todos os outros da minha vida.

A Deus que é meu mentor.

Agradeço a toda equipe da DRM em especial a Viviane Piccin dos Santos, que sempre me auxiliou em todos os momentos dentro e fora da DRM. Bibi sinto muita saudade de todos os dias te esperar em frente ao Dia % para irmos junto à DRM, das conversas, do pastelzinho de fubá no Ponto 1, da coxinha no Estação Barão e de desbravarmos o intenso trânsito em Campinas, principalmente nos dias chuvosos, rrsrs.

À Ana Paula do LVA por ser tão disposta a me ajudar sempre em todos os momentos e etapas dos ensaios antivirais. Pessoa maravilhosa que serei eternamente grata.

A todos os meus amigos da DRM. Muito obrigada pessoal pela ajuda, amizade e companheirismo dentro do laboratório e também fora dele.

A todos os meus amigos que contribuíram não com o auxílio de técnicas científicas, mas com a vivência de momentos felizes, momentos esses fundamentais para que a energia fosse renovada e eu pudesse seguir em frente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo N^o 2013/05113-8).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Pesquisa (Processo N^o 2013/05961-9) coordenado pela Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini.

RESUMO

O ambiente marinho é uma preciosa fonte de diversidade biológica e genética, especialmente de micro-organismos. Embora a diversidade da comunidade microbiana nos ambientes marinhos seja muito ampla, especialmente nos ambientes extremos como o continente Antártica, pouco se conhece sobre essa diversidade. Muitos desses micro-organismos, são produtores de metabólitos secundários, podendo produzir compostos naturais com aplicações na indústria farmacêutica, entre outras aplicações de bioprospecção. Esse trabalho identificou por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S, 145 isolados de sedimentos e macro-organismos marinhos, como Salpa, Ascídia, Líquens e Algas oriundos da Baía do Almirantado, Ilha de Rei George, Antártica. Esses 145 isolados foram alocados em 4 filos; Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e identificados em 28 gêneros distintos. Dentre esses 145 isolados alguns podem ser novas espécies. Além disso, foram produzidos 22 extratos microbianos oriundos do gênero *Pseudoalteromonas* (2 extratos), *Psychrobacter* (4 extratos), *Planococcus* (3 extratos), *Bacillus* (2 extratos), *Brevibacterium* (2 extratos), *Kocuria* (1 extrato), *Arthrobacter* (1 extrato), *Pseudomonas* (2 extratos), *Saccharopolyspora* (1 extrato), *Salinibacterium* (3 extratos) e *Rhodococcus* (1 extrato). Posteriormente esses extratos foram submetidos a extração líquido-líquido com a utilização do solvente acetato de etila para a obtenção da fração orgânica, essas foram submetidas a ensaios antivirais. Os ensaios avaliaram o potencial antiviral contra o Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) e contra o Bovine viral diarrhea virus (BVDV). O HSV-1 é um vírus que afeta principalmente a região orofacial dos seres humanos e BVDV é um dos principais patógenos bovinos, ambos os vírus apresentam distribuição mundial. Dos 22 extratos avaliados apenas 1, identificado como *Pseudomonas* sp. apresentou 99% de proteção contra o vírus HSV-1 e índice de seletividade de 8,88%. Nenhum extrato apresentou inibição igual ou superior a 97% de proteção contra o vírus BVDV. Esse trabalho evidenciou a possibilidade de revelar novas espécies de bactérias e de compostos biologicamente ativos com potencial anti-herpético oriundo do gênero *Pseudomonas*.

Palavras-chave: Antártica, Bactéria, Extrato Microbiano, Extração líquido-líquido, Atividade Antiviral.

ABSTRACT

The marine environment is a precious source of biological and genetic diversity, especially of micro-organisms. While the diversity of the microbial community in marine environments is very wide, especially in extreme environments such as the Antarctic continent, little is known about this diversity. Many of these micro-organisms are producers of secondary metabolites and can produce natural compounds with applications in the pharmaceutical industry, among other bioprospecting applications. This work identified by 16S rRNA sequencing, 145 isolated from marine sediments and macro-organisms as Salpa, Squirt, Lichens and Algae coming from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. These 145 isolates were belonging to 4 phyla; Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes and were identified in 28 distinct genera. Between these 145 isolates it is possible had isolated new species of bacteria. In addition, we produced 22 microbial extracts derived from *Pseudoalteromonas* (2 extracts), *Psychrobacter* (4 extracts), *Planococcus* (3 extracts), *Bacillus* (2 extracts), *Brevibacterium* (2 extracts), *Kocuria* (1 extract), *Arthrobacter* (1 extract), *Pseudomonas* (2 extracts), *Saccharopolyspora* (1 extract), *Salinibacterium* (3 extracts) and *Rhodococcus* (1 extract). Subsequently, these extracts were undergoing liquid-liquid extraction with the use of ethyl acetate solvent to obtain the organic fraction; these were subjected to antiviral assays. The assays evaluated the antiviral potential against Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and against Bovine viral diarrhea virus (BVDV). HSV-1 is a virus that mainly affects the orofacial region of human and BVDV is major cattle pathogens, both viruses have worldwide distribution. Of this 22 extracts only one, identified as *Pseudomonas* sp. showed 99% protection against HSV-1 and 8.88% selectivity index. No extract showed inhibition less than 97% protection against BVDV virus. This work highlighted the possibility to reveal new species of bacteria and biologically active compounds with anti-herpetic potential derived from the genus *Pseudomonas*.

Keywords: Antarctic, Bacteria, Microbial extract, liquid-liquid extraction, antiviral activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organismos marinhos coletados no continente Antártico na expedição verão 2010 e utilizados para o isolamento de bactérias (Nobre. F. S., 2010). 30
- Figura 2.** Localização da Ilha do Rei George, onde foi realizada a coleta do presente estudo (Bolter et al., 1997). 31
- Figura 3.** Imagem ilustrativa da montagem de microplacas com monocamadas de células para os ensaios de atividade antiviral. 37
- Figura 4.** Imagem ilustrativa da montagem da micorplaca para determinação e leitura do índice de seletividade (IS). 40
- Figura 5.** Abundância dos Filos identificados nas amostras coletadas da Baía do Almirantado, Ilha de Rei George, Antártica..... 43
- Figura 6.** Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Psychrobacter* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. . 59
- Figura 7.** Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. 61
- Figura 8.** Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Planococcus* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. 62
- Figura 9.** Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos gêneros do Filo Actinobacteria isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. . 65
- Figura 10.** Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* isoladas da Antártica.

Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições 66

Figura 11. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições... 67

Figura 12. Observação em microscopia óptica do efeito citopático do vírus HSV-1 na célula VERO (Nery. M. B.P., 2015)..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número dos isolados de bactérias recuperados de macro-organismos marinhos e amostras de sedimento coletados no continente Antártico e identificados por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.....	44
Tabela 2. Relação do rendimento final, em grama, da fase orgânica obtida a partir da extração líquido-líquido de cada isolado microbiano.....	68
Tabela 3. Avaliação da atividade anti-herpética frente ao vírus HSV tipo 1 dos extratos brutos obtidos dos isolados bacterianos.....	69
Tabela 4. Avaliação da atividade antiviral do vírus BVDV dos extratos brutos obtidos dos isolados bacterianos	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius
µL	Microlitros
16S rRNA	RNA ribossomal 16S
ASW	Artificial Sea Water (Água marinha artificial)
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CC₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
cm	Centímetro
CP	Citopático
CPQBA Agrícolas	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e
CO₂	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DRM	Divisão de Recursos Microbianos
ECP	Efeito Citopático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
h	Hora
HSV-1	Herpes vírus simplex tipo 1
HSV-2	Herpes vírus simples tipo 2
IC₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento viral
IS	Índice de seletividade

kDa	Quilodalton
Km	Quilômetro
L	Litro
M	Molar
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MEM	Meio Mínimo de Eagle
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	miliMolar
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazólio brometo
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCP	Não Citopático
ng	nanograma
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação de polimerase em cadeia)
pH	Potencial hidrogeniônico
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino

TE	Tampão Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3. OBJETIVO	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Micro-organismos utilizados no estudo	30
4.2. Identificação dos isolados bacterianos por análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S	32
4.2.1. Extração e quantificação de DNA genômico	32
4.2.2. Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S	33
4.3. Obtenção de extratos brutos microbianos	34
4.4. Ensaio da atividade antiviral	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Diversidade e caracterização dos isolados.....	41
5.1.1. Os macro-organismos e a diversidade bacteriana	46
5.1.2. Principais características dos gêneros de bactérias identificados	51
5.1.3. Identificação dos isolados bacterianos por análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S	57
5.1.3.1. Gênero <i>Psychrobacter</i>	58
5.1.3.2. Gênero <i>Pseudomonas</i>	60
5.1.3.3. Gênero <i>Planococcus</i>	61
5.1.3.4. Gêneros <i>Brevibacterium</i> , <i>Salinibacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> e <i>Kocuria</i>	62
5.1.3.5. Gênero <i>Bacillus</i>	65
5.1.3.6. Gênero <i>Pseudoalteromonas</i>	66
5.2. Ensaio antiviral	67
5.2.1. Ensaio MTT e determinação do índice de seletividade (IS)	73
5.2.2. Mecanismo de ação do vírus HSV-1	74

6.	CONCLUSÕES	74
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9.	ANEXOS	88
9.1.	Anexo A- Declaração de direitos autorais	88
9.2.	Anexo B- Declaração referente a Bioética e Biossegurança	89

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos representam a maior biodiversidade do planeta, sendo possível revelar uma enorme variedade de componentes com elevados potenciais farmacêuticos, nutricionais e cosméticos que podem agregar grande valor comercial na economia mundial (Faulkner, 2002). O continente Antártico é circundado pelo oceano Antártico e apresenta aproximadamente, em seu território, 98% de uma espessa camada de gelo, com 2% de rochas encontradas entre 2.000 - 4.000 m acima do nível do mar. Nesse ambiente são encontrados vários microclimas e nanoclimas que são muito variáveis e instáveis, apresentando características particulares de micro-organismos que vivem em regiões diferentes. Segundo Gandhimathi (2008) há um elevado número de bactérias e cianobactérias associadas a esponjas marinhas que são produtoras de antibióticos e outros compostos biologicamente ativos. Por isso houve um intenso interesse em isolar e identificar novos compostos biologicamente ativos, derivados de micro-organismos marinhos, nas últimas décadas (Weiner, 1997).

Os micro-organismos apresentam uma extensa e variada diversidade de espécies. A maioria dos micro-organismos realiza seus próprios processos vitais, entretanto, alguns estão associados com outros organismos multicelulares para garantir a sobrevivência. Até o presente momento, as bactérias representam uma grande diversidade morfológica, fisiológica e evolutiva, e estão alocadas em mais de 20 filos cultiváveis e outros 20 a 30 filos não cultiváveis (Madigan e colaboradores, 2004). Alguns filos; Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes podem ocupar nichos ecológicos em ambientes sob condições adversas e extremas como o continente Antártico.

Os compostos secundários derivados de micro-organismos podem ser uma excelente ferramenta no controle das epidemias e manifestações clínicas das doenças que afetam a saúde pública e a economia pecuária, como as doenças virais Herpes Vírus Simples e Diarreia Viral Bovina, respectivamente.

O Herpes Vírus Simplex (HSV) é um vírus da família Herpesviridae. Esse vírus pode ser classificado em Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) e Herpes Vírus Simplex tipo 2 (HSV-2). A infecção do HSV não apresenta cura, pois quando infecta a célula hospedeira entra em estado de latência e de tempos em tempos ocorre a reinfecção. Atualmente as drogas comercializadas para o controle desse vírus são: o aciclovir, penciclovir, fanciclovir, valaciclovir, trifluridina e vidarabina (Hassan et al., 2015). O Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) predominantemente causa infecções orofaciais,

apresentando vesículas aglutinadas que se rompem. É uma infecção que causa bastante desconforto e pode afetar o estado emocional dos infectados, além de possivelmente desencadear outras doenças (Staikov et al., 2015).

O *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) pertence à família Flavovirinae, gênero Pestivirus. O vírus é classificado em dois grupos antigênicos principais; BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2. Os vírus BVDV tipo 1 (Não citopático- NCP) são, na maioria, vírus vacinais e o BVDV tipo 2 (Citopáticos- CP) são cepas mais severas (Pinto et al., 2012). Esse vírus apresenta distribuição mundial e a infecção de animais pelo BVDV pode ocasionar infecções subclínicas, doenças respiratórias, digestivas e reprodutivas, síndromes hemorrágicas, doenças cutâneas, imunossupressão, trombocitopenia (Flores et al., 2005).

Os vírus são capazes de sofrer mutações em um curto intervalo de tempo. Essa capacidade seleciona as cepas de vírus que são mais resistentes as drogas utilizadas no seu controle. Isso é um sério problema para a saúde pública, pois praticamente anula a eficiência dos atuais compostos utilizados, sendo indispensável o desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos no tratamento das doenças virais.

Alguns Filos de bactérias são conhecidos por apresentarem compostos secundários com aplicações antimicrobianas, anticâncer, antitumor e antiviral (Mayer, 2007; Tong et al., 2012). Actinobacteria é o Filo com maior número de compostos identificados com essas propriedades, destacando o gênero *Streptomyces* como o principal produtor desses compostos (Ginolhac et al., 2004; Vignesh, et al., 2011). Por isso a investigação científica da diversidade microbiana e dos compostos químicos oriundos de metabólitos secundários de bactérias marinhas, principalmente de ambientes extremos como a Antártica, é indispensável, pois pode revelar novas moléculas bioativas eficientes no controle do HSV-1 e do BVDV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O continente Antártico apresenta um território de 14.000.000 Km (Bockheim et al., 2015), além de ser um território extenso contém 90% do gelo mundial e influencia as dinâmicas atmosféricas globais. Apenas 45.000 Km² do território é área livre de gelo, dentre essa área McMurdo Dry Walleys é a maior área com 6.692 Km² (Ugolini & Bockheim, 2008).

A Antártica está localizada no Polo Sul Geográfico, ela é dividida em continente e península, e é circundada pelo oceano Antártico (Thomas et al., 2008). As superfícies terrestres desse continente são cobertas por gelos que podem atingir até 5 Km de espessura e a superfície de mar congelado varia de 2.7.000.000 Km² a 22.000.000 Km² no verão e inverno, respectivamente.

A temperatura média anual varia de – 35 °C no platô antártico e 0 °C na costa no período de verão e no período de inverno varia entre – 55 °C no interior do continente e – 20 °C na região costeira. A precipitação ocorre principalmente na forma de neve, mas há chuvas no verão quando ocorrem temperaturas acima de 0 °C.

A península Antártica é uma cordilheira de 1.500 m de altitude e mais de 2.500 Km de extensão (Bianchini et al., 2006). Nessa região ocorre a Zona de Convergência Antártica. Nessa Zona de Convergência ocorrem interações das águas frias do oceano Austral com águas mais quentes dos oceanos Pacífico e Atlântico que interferem nas condições meteorológicas locais. O norte da península apresenta temperatura média de 0 °C, isso facilita a ocorrência de precipitações na forma de chuva. Nos meses de verão a temperatura do ar se eleva e ocorre derretimento das geleiras e das neves sazonais da região costeira, expondo o solo ou a rocha (Bianchini et al., 2006).

A Ilha de Rei George está localizada na região noroeste a 120 Km da Península Antártica. Ela compõe, juntamente com outras 11 ilhas, as ilhas do Arquipélago de Shetland do Sul. Dentre as ilhas, a ilha Rei George é a maior, com 1.140 Km. A espessura máxima do gelo atinge 357 metros e abrange 92,7% de seu território (Bianchini et al., 2006). O regime climático nessa ilha é subpolar marítimo com temperatura anual entre – 0 °C e – 7 °C no verão e inverno, respectivamente (Bianchini et al., 2006).

A biodiversidade da Antártica é predominantemente composta por micro-organismos, embora também seja possível encontrar macro-espécies (Bradner, 2003). Segundo Bradner (2003) é possível dividir as macro-espécies encontradas na Antártica

em espécies endêmicas e exóticas. As espécies endêmicas são caracterizadas por passar todo o seu ciclo de vida no continente Antártico ou em áreas próximas ao continente. As espécies exóticas são aquelas espécies que não são características do ambiente, mas que foram introduzidas, principalmente pela atividade humana.

Invertebrados marinhos pertencentes às classes *Porifera*, *Mollusca*, *Cnidaria*, *Anthozoa*, *Echinodermata*, e *Bryozoa* são uma fonte rica de vários metabólitos bioativos (Bérdy, 2005). No entanto, evidências sugerem que em muitos dos casos os compostos ativos isolados desses animais são oriundos de micro-organismos simbióticos (Bérdy, 2005). Como exemplo, a esponja *Mycale adhaerens*, da qual foi isolado o composto exofilina A, um ácido dihidroxidecanoico ativo contra bactérias Gram positivas. Tal composto é produzido não pela esponja, mas pelo micro-organismo *Exophiala pisciphila* a ela associado (Doshida *et al.*, 1996).

O ecossistema marinho antártico é um ambiente extremo e único que permanece largamente inexplorado. As associações micro-organismos e invertebrados são raramente estudadas. A maioria dos esforços de pesquisa tem incidido sobre a água do mar, o gelo e comunidades microbianas do sedimento do ambiente antártico (Webster & Browman, 2007). Pesquisas revelaram muitas espécies novas de bactérias oriundas da Antártica; *Psychrobacter urativorans* e *Psychrobacter frigidicola* (Bowman *et al.*, 1996), *Arthrobacter gangotriensis* e *Arthrobacter kerguelensis* (Gupta *et al.*, 2004), *Agrobacterium radiobacter*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingobacterium multivorum* (Zdanowski *et al.*, 2005), entre outras (Kim *et al.*, 2012).

Zeng e colaboradores (2014) analisaram a diversidade de bacterioplâncton da Ilha de Rei George e identificaram bactérias pertencentes aos grupos Bacteroidetes, Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria. Os gêneros de maior abundância foram *Polaribacter*, *Sulfitobacter*, *Loktanella*, *Cocleimonas*, *Arenicella*, *Granulosicoccus* e *Polaromonas*.

Kim e colaboradores (2012) analisaram a diversidade bacteriana de solos ornitogênicos da Ilha de Rei George, Antártica. A análise dessa diversidade foi realizada por pirosequenciamento utilizando o gene RNA ribossomal 16S e revelou que o filo mais abundante no solo ornitogênico foi Firmicutes, isso pode ser explicado pela elevada ocorrência desse Filo nas fezes e intestinos de aves. O segundo filo mais abundante foi Proteobacteria com predominância dos gêneros *Psychrobacter* e *Pseudomonas* em solos ornitogênicos.

Rampelotto e colaboradores (2014) analisaram por método de independente de cultura a variação da diversidade da bactérias presentes em solos ornitogênicos em 3 profundidades diferentes; 0 - 8cm, 20 - 25 cm e 35 - 40 cm. Foi observado que na camada mais superficial (0 - 8cm) os grupos *Lactobacillales* (Firmicutes), *Fusobacteriales* (Fusobacteria) e *Desulfuromonadales* (Deltaproteobacteria) foram os mais abundantes, enquanto que *Solirubrobacterales* (Actinobacteria), *Enterobacteriales*, e *Xanthomonadales* (Gammaproteobacteria) são os mais abundante da camada mais profunda (35 - 40 cm). A diversidade microbiana do continente Antártico vem sendo estudada há poucas décadas, mas é possível observar que é uma diversidade de considerável riqueza biológica e deve ser considerada de extrema importância e relevância, pois muitos compostos bioativos derivados de organismos marinhos apresentam atividades farmacológicas, seja como anticâncer, antitumor, antimicrobiana e menos frequente atividade antiviral. Foram relevadas 13.000 moléculas isoladas de organismos marinhos, dentre essas 3.000 apresentam propriedades farmacológicas ativas (Vigneshi, Raja, James, 2011). Portanto, é fundamental investigar, isolar e identificar novos produtos naturais microbianos marinhos que tenham aplicação em vários setores das indústrias (Weiner, 1997).

Produtos naturais e seus derivados são amplamente utilizados na medicina humana para combater inúmeras doenças, incluindo infecções bacterianas, virais e fúngicas, câncer, disfunções do sistema imunológico, entre outras (Baltz & Busti, 2006). Ao longo dos últimos 50 anos, compostos naturais produzidos por micro-organismos, especialmente Actinobactérias, têm sido amplamente usados para desenvolver a maioria das drogas antibacterianas utilizadas pela indústria farmacêutica (Ginolhac *et al.*, 2004).

Cerca de 75% de novas drogas para doenças infecciosas e 60% para câncer, provem de produtos naturais. Esses produtos naturais com aplicação industrial e humana podem ser derivados do metabolismo primário ou secundário de micro-organismos ou de plantas. De 50 a 60% dos compostos (alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides e carboidratos) desses produtos são obtidos de plantas e 5% de micro-organismos. É importante ressaltar que dos 22.500 compostos biologicamente ativos, 45% provem de actinomicetes, 38% de fungos e 17% de bactérias unicelulares (Vignesh, *et al.*, 2011). Isto demonstra como são importantes os estudos de caracterização e investigação do potencial biotecnológico industrial e medicinal desses micro-organismos.

Arena e colaboradores (1996) relataram a atividade antiviral e os efeitos imunorregulatórios de um exopolissacarídeo de termotolerantes, *Bacillus licheniformis*, isolados de Sahlow, Ilha Vulcano (Itália). Outro estudo, *in vitro*, realizado por Baba e colaboradores (1988) demonstra que polissacarídeos de sulfatos tem efeitos antivirais contra vírus envelopados. Yasuhara-Bell e colaboradores (2010) realizaram um estudo com extratos marinhos aplicados em culturas de células Vero e foi possível analisar resultados de inibição para o Herpes Vírus Simplex (HSV-1).

Tong e colaboradores (2012) produziram 38 extratos microbianos derivados do arquipélago de Hawaii, localizada no meio do Oceano Pacífico, e analisaram o potencial de inibição desses extratos para 4 vírus de mamíferos. O resultado deste estudo foi que nove dos 38 extratos apresentaram propriedades antivirais e três dos nove tiveram significativa atividade contra vírus envelopados.

Mayer (2007) revela que de 166 compostos químicos isolados de micro-organismos marinhos, 67 compostos apresentam atividades antivirais, anti-helmíntica, antifúngica, antiprotozoária, anticoagulante, antimalárica, antiplaquetária, antituberculose e antibacteriana. Dentre os 166, 45 tem efeito considerável nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico, além de atividade anti-inflamatória.

Durante o ano de 2003 e 2004 foram encontrados sete novos compostos marinhos com propriedades antivirais contra o vírus da imunodeficiência humana, o HIV. Esses dados foram coletados e analisados no ano de 2003 e 2004, podendo ter aumentado o número de compostos marinhos com atividade antiviral nos dias atuais (Mayer *et al.*, 2004).

ARA-C, anticâncer, e ARA-A, agente antiviral contra o vírus do herpes e contra o vírus da varicela zoster, são compostos isolados da esponja marinha *Tethya crypta*. ARA-A foi o único agente antiviral aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Muitos antivirais derivados de esponjas marinhas ainda estão na fase pré-clínica e clínica (Sagar, Kauer, Minneman, 2010).

É importante compreender e investigar a diversidade microbiana como potencial produtora de compostos bioativos naturais no tratamento de doenças infecto-contagiosas que afetam a saúde pública dos seres humanos. Dentre essas diversas doenças o Herpes Vírus Simplex, é um vírus que afeta principalmente a pele e as membranas mucosas, mas recentemente a ciência vem descobrindo que esse vírus pode desencadear uma ação sistêmica, comprometendo outros sistemas do corpo humano (Staikov *et al.*, 2015).

Apesar de ainda existirem poucos produtos naturais isolados de algas, bactérias, fungos, organismos marinhos e plantas, existe evidência que descreve o potencial desses contra o Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) (Harden et al., 2009). Os principais compostos químicos bioativos pertencem a classe dos nucleosídeos, polissacarídeos e peptídeos (Hassan et al., 2015). Essas evidências justificam o interesse de estudar os extratos microbianos das bactérias isoladas desses estudos contra o Herpes vírus simplex tipo 1 e o vírus da diarreia bovina (BVDV).

Vírus é um dos micro-organismos mais numerosos em nosso planeta e são capazes de infectar todos os tipos de seres vivos. O genoma de um vírus pode apresentar fita dupla ou fita simples de DNA ou RNA, (Madigan et al., 2008). Eles podem ser compreendidos como elementos genéticos capazes de se replicar independentemente do genoma de uma célula, porém não independentemente de uma célula, pois são parasitas intracelulares obrigatórios.

Ao infectar a célula ocorre a replicação viral para se produzir novas partículas virais. As fases da replicação do vírus podem ser compreendidas em 5 etapas: adsorção, penetração, síntese de ácidos nucleicos e proteínas, montagem e liberação.

Na adsorção, a interação espícula viral (proteínas Virais) com o receptor superfície celular apresenta especificidade, pode resultar na infecção celular. Na ausência de receptores o vírus não consegue se adsorver na célula, sendo inviável promover a infecção (Madigan et al., 2008).

Após o vírus conseguir se adsorver na célula ocorre a penetração do vírus e replicação do ácido nucléico. Uma vez o vírus adsorvido e penetrado na célula, ocorre a replicação do ácido nucléico. Essa replicação somente ocorrerá se a célula for permissiva, ou seja, decodifique o material genético viral. No processo de replicação o vírus envelopado precisa ser desnudado, isso significa que precisa perder sua cápsula para que o genoma seja liberado no citoplasma, esse desnudamento pode ser realizado na membrana celular ou no citoplasma, e possa iniciar a síntese de suas proteínas. Essas proteínas virais são classificadas em precoces e tardias. As proteínas precoces são fundamentais para a replicação do ácido nucléico viral e as tardias para a produção estrutural do capsídeo, caso o vírus apresente capsídeo.

Com a síntese do ácido nucléico e das proteínas virais já realizadas ocorre o processo de organização e montagem. Nesse processo o ácido nucléico é empacotado e

organizado nas cápsulas proteicas. Finalizando o processo de replicação eles são liberados da célula.

O Herpes Vírus Simplex manifesta uma doença viral infectocontagiosa que afeta a saúde pública, principalmente com quadros muco cutâneos e neurológicos, com possibilidade de desencadear reações sistêmicas nos indivíduos portadores desse vírus. Esse vírus apresenta cepas que podem causar doença genital, orofacial e neonatal. Pertence à família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e é classificado em Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) e Herpes Vírus Simplex tipo 2 (HSV-2) (James & Kimberlin., 2015).

O HSV é capaz de se replicar no sistema nervoso e de permanecer em estágio de latência, ocorrendo reativação da infecção. Até o presente momento o ser humano é o único hospedeiro desse vírus e a transmissão se dá por contato interpessoal. A infecção pode ser adquirida por contatos: oral, sexual ou na passagem pelo canal de parto (Yakoub & Shukla, 2015).

A replicação desse vírus se inicia pela penetração nas mucosas intactas ou lesionadas, o vírus é então transportado para a raiz do gânglio dorsal onde se replica e se estabelece em estágio de latência. O vírus pode ser reativado por estímulo espontâneo ou por atrito, febre, exposição a UV, desgaste físico, desgaste emocional, entre outros fatores. Quando o vírus é reativado ele percorre os nervos sensitivos e causa lesões na pele e mucosas. Essas lesões são caracterizadas pela presença de vesículas agrupadas que evoluem para pústulas, pequenas ulcerações ou crostas (Engel et al., 2015).

O Herpes Vírus Simplex é um vírus com envelope que apresenta fita dupla de DNA. Esse vírus codifica glicoproteínas que são responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes. As enzimas que participam da replicação viral, Timidina quinase e DNA polimerase são os principais alvos das drogas antivirais (Engel et al., 2015).

O Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) predominantemente causa infecções orofaciais, afetam principalmente criança de 6 meses a 5 anos de idade, mas pode atingir adultos de todas as faixas etárias. A região orofacial apresenta vesículas aglutinadas que se rompem. É uma infecção que causa bastante desconforto e pode afetar o estado emocional dos infectados que podem se sentir constrangido com a má aparência das vesículas (Staikov et al., 2015). Visto que essa infecção atinge 85% da população mundial, nem todos os indivíduos manifestam a infecção, essa é uma

problemática da saúde pública que não pode ser ignorada e necessita de aplicações de novos compostos no controle desse vírus.

As infecções causadas pelo vírus do herpes são classificadas em três tipos: infecção primária, que pode ser assintomática ou sintomática, apresentando, neste caso, quadros de febre, úlceras na garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivo-estomatite, edema e outros; infecção neonatal, que pode ocorrer *in utero*, durante ou após o parto; e infecção do sistema nervoso central, que pode apresentar encefalite hemorrágica focal (Gonçalves et al., 2001).

Os agentes químicos mais utilizados no tratamento de HSV são aciclovir, penciclovir, fanciclovir, valaciclovir, trifluridina e vidarabina. Todos esses agentes atuam como inibidores da DNA polimerase, ou seja, não permitem que o vírus se replique (Hassan et al., 2015). Os vírus apresentam taxas de mutações elevadas, por isso a utilização expressiva de um mesmo agente químico no controle do seu ciclo pode deixar de ser eficiente em um curto intervalo de tempo, sendo assim é necessário desenvolver novos compostos bioativos que auxiliem no controle desse vírus que afeta a saúde pública.

Nas últimas décadas a produção científica vem apresentando resultados mais otimistas de possíveis novos compostos com ação anti-herpética, mas ainda há muito que se investigar sobre a eficiência, viabilidade e segurança desses compostos.

Bianchi (2012) investigou o potencial antiviral de extratos marinhos contra o vírus HSV-1 e identificou que 13 deles apresentavam 97% ou mais de atividade antiviral. Desses 13 extratos 7 eram derivados de fungos marinhos e 6 de esponjas marinhas. Após análise das atividades dos extratos foram feitas as identificações e as espécies de esponjas identificadas foram *Hemimycale* sp., *Monanchora arbuscula* e *Didimnum ligulum*. Os fungos identificados foram *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp..

Existem também evidências de que polissacarídeos sulfatados oriundos de algas marinhas vermelhas apresentam eficiência antiviral contra os vírus envelopados, mas ainda pouco se conhece sobre a produção desses polissacarídeos, é preciso mais estudos para identificar se os polissacarídeos são derivados de bactérias associadas as algas ou se são derivados das algas (Rashid et al., 2009).

Compostos isolados de algas marinhas das espécies *Scinaia hatei*, *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata*, *Bostrychia montagnei*, *Spirulina platensis*

apresentaram atividade anti-herpética. Também é possível encontrar compostos, com potencial anti-herpético, oriundos de bactérias da espécie *Actinomadura namibiensis*. De uma forma geral, os produtos naturais com propriedade anti-herpética derivados de plantas, animais, fungos e bactérias pertencem a classe química dos nucleosídeos, polissacarídeos, peptídeos, terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Hassan et al., 2015).

Embora novos produtos naturais com propriedades anti-herpéticas tenham sido descobertos, ainda é necessário potencializar e avançar nos estudos, pois as drogas anti-herpéticas não eliminam a infecção, elas apenas controlam a replicação do vírus. Por isso, é fundamental que sejam desenvolvidos estudos científicos que avaliem e investiguem o potencial anti-herpético de bactérias marinhas e seus benefícios para a saúde pública.

Outro vírus também relevante para estudos e investigações científicas é o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Esse vírus é um dos principais patógenos dos bovinos e afeta negativamente a economia pecuária. O BVDV pertence à família Flaviridae, gênero *Pestivirus*. *Pestivirus* são vírus envelopados e apresentam genoma de RNA fita simples. Eles podem ser classificados em dois grupos antigênicos principais; BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2. O BVDV tipo 1 (Não citopático- NCP) são, na maioria, vírus vacinais e o BVDV tipo 2 (Citopáticos- CP) são cepas mais severas (Pinto et al., 2012).

O BVDV é frequentemente associado com quadros clínicos de gastroenterites, mas pode também estar associado com fenômenos reprodutivos. O vírus pode causar infertilidade reprodutiva temporária, aborto do feto, malformações fetais, retorno ao cio e até mesmo o nascimento de bezerros fracos. A infecção de fêmeas prenhas, entre 40-120 dias de gestação, com isolados de BVDV NCP gera bezerros persistentemente infectados e imunotolerantes ao vírus. Esses animais persistentemente infectados são soronegativos, clinicamente normais e podem excretar o vírus durante toda a vida (Ridpath, 2013).

O vírus BVDV apresenta distribuição mundial e em países considerados livres de febre aftosa esse agente viral é alvo de diversos programas de controle e erradicação. A infecção de animais pelo BVDV pode ocasionar infecções subclínicas, doenças respiratórias, digestivas e reprodutivas, síndromes hemorrágicas, doenças cutâneas, imunossupressão, trombocitopenia (Flores et al., 2005).

No Brasil a presença desse vírus foi observada no final da década de 60 e os primeiros estudos sorológicos sobre o BVDV ocorreram na década de 70. O primeiro isolado desse vírus no Brasil ocorreu em 1974, mas devido a problemas de estrutura e manutenção do laboratório esse isolado foi perdido. Embora esse vírus tenha recebido atenção por sua importância sanitária e econômica, ainda nos dias atuais são poucos os números de laboratórios que realizam diagnósticos de rotina sobre o BVDV (Flores et al., 2005).

Visto a importância sanitária e econômica desse vírus é fundamental também o desenvolvimento de novas drogas para o controle do BVDV. Os estudos que relevam potenciais produtos naturais com compostos biologicamente ativos contra o BVDV ainda são insuficientes para auxiliar no controle do vírus, por isso é fundamental estudos que avaliem e isolem novos compostos químicos naturais com potencial antiviral contra o BVDV.

Atualmente as vacinas são intensamente utilizadas para o controle do BVDV, mas ainda não são eficientes no controle das doenças ocasionadas por *Pestivirus*. As vacinas mais eficientes devem impedir que ocorra a transmissão intrauterina do vírus para o feto. A complexidade em produzir vacinas eficientes para esse vírus é que eles apresentam uma variedade genotípica muito alta e as taxas de mutações do vírus também são relevantes, sendo necessário desenvolver novas vacinas e outros medicamentos constantemente (Newcomer & Givens, 2013).

A maioria das drogas antivirais para o BVDV utilizada nos dias atuais apresenta a RNA polimerase como o seu principal alvo, mas existem também outros mecanismos e vias que as drogas podem atacar. Devido as elevadas taxas de mutações dos vírus as terapias que combinam mais de um método têm apresentado resultados mais eficientes quando comparadas com as monoterapias. Isso é um resultado interessante, pois a combinação de diferentes drogas com diferentes alvos pode ser uma ferramenta poderosa para evitar a seleção de vírus resistentes ao tratamento e, assim, potencializar a terapia utilizada no controle e erradicação do vírus (Newcomer & Givens, 2013).

Devido a prática da vacinação no controle do BVDV ter apresentado resultados otimistas desde a década de 60 até os dias atuais, ainda são poucas as referências científicas que relevam compostos naturais biologicamente ativos, mas o interesse dos cientistas em descobrir novas drogas para atuarem em terapias conjuntas com as vacinas vem aumentando.

Alguns compostos químicos derivados de bactérias pertencentes ao Filo Actinobacteria apresentam capacidade de inibir o vírus BVDV (Padilla et al., 2015). Bactéria *Bacillus sp* isolada de esponja marinha da espécie *Petronica citrina* também apresenta capacidade de inibir o vírus BVDV, impedindo sua adsorção nas células (Bastos et al., 2013). Essas evidências são bastante otimistas, porém as investigações científicas sobre as bactérias como potenciais produtoras de compostos farmacológicos ativos ainda são insuficientes e incompatíveis com a demanda e necessidade emergente do desenvolvimento de novos compostos no tratamento de doenças virais como o BVDV e o HSV-1. Por isso é fundamental para a ciência o conhecimento profundo sobre a diversidade bacteriana, principalmente de ambientes extremos como a Antártica, pois esse pode ser o caminho para a utilização de recursos biológicos que produzem novos compostos farmacológicos ativos eficientes e seguros para a utilização na saúde pública e pecuária.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo a identificação da diversidade de bactérias isoladas de macro-organismos marinhos e de sedimentos oriundos da Baía do Almirantado (Ilha Rei George), Antártica, e a avaliação do potencial antiviral de extratos microbianos obtidos de 22 isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos utilizados no estudo

As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de organismos e sedimentos marinhos por membros da equipe da Divisão de Recursos Microbianos (UNICAMP/CPQBA/DRM) e mantidos no acervo de pesquisa da Divisão. Os sedimentos e organismos marinhos de diferentes espécies entre elas, uma esponja, uma ascídia, uma salpa, e 5 algas (Figura 1), foram coletadas por Msc. Fernando Suzigan Nobre (CPQBA/UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Hadju (UFRJ) e pela equipe da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari (IO/USP) em diferentes pontos de coleta, próximos a Estação Brasileira Comandante Ferraz, Antártica (Figura 2), durante expedição a Antártica pelo Programa Antártico Brasileiro no verão de 2010.

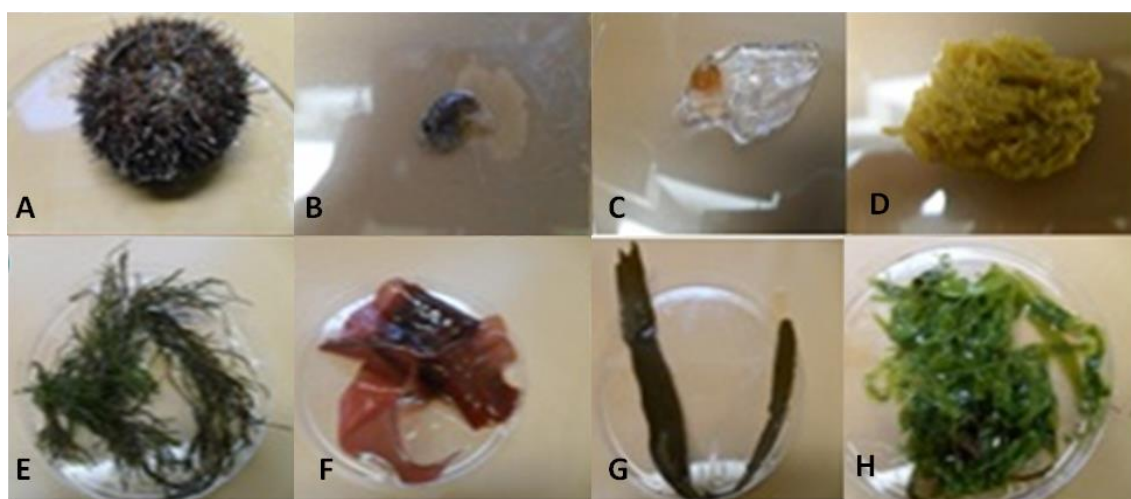


Figura 1. Organismos marinhos coletados no continente Antártico na expedição no verão de 2010 e utilizados para o isolamento de bactérias. **A)** – Ouriço-do-mar, **B)** – Ascídia; **C)** – Salpa; **D)** – Esponja; **E, F, G, H)** – Algas. Fonte: Fernando Suzigan Nobre.

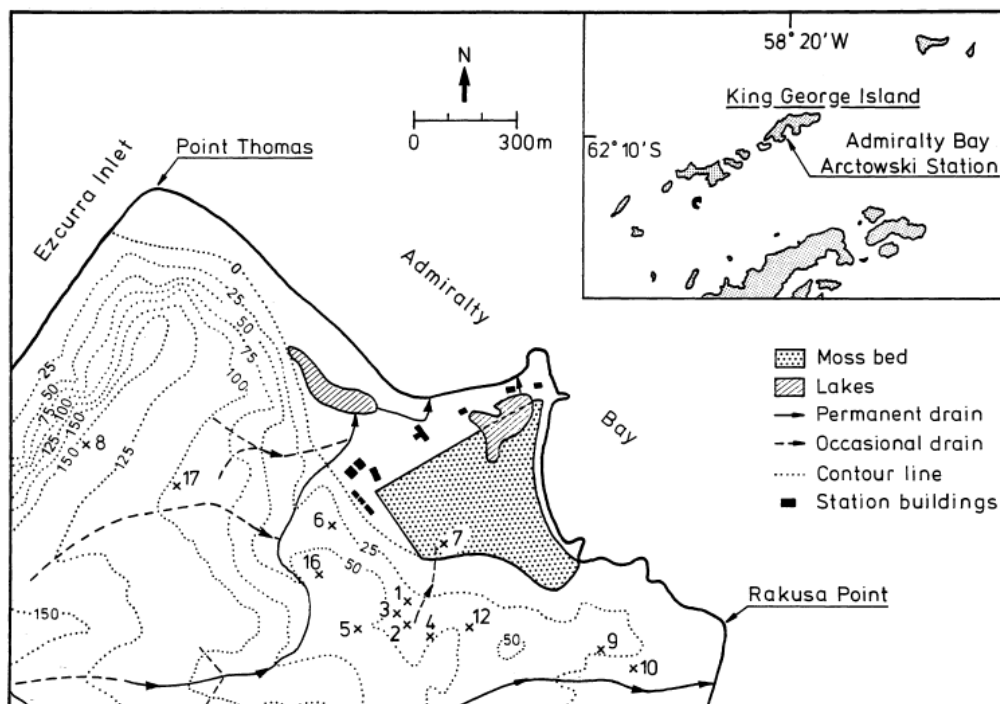


Figura 2. Localização da Ilha do Rei George, onde foi realizada a coleta do presente estudo.

Fonte: Bolter et al., 1997.

No isolamento os organismos marinhos foram triturados em homogeneizador e diluições (10^{-2} e 10^{-4}) foram semeadas em dois meios de cultivo, M1 (Mincer *et al.*, 2002) e *Yeast malt-extract medium* (ISP2), acrescidos de actidiona (50 mL/L). Já os sedimentos foram diluídos em água do mar artificial e as diluições (10^{-2} e 10^{-4}) semeadas nos mesmos meios de cultivo. Todas as placas foram incubadas a 28 °C por 24 a 72 h. Após crescimento, 153 isolados distintos foram selecionados com bases na morfologia das colônias e das células e foram preservados pelo método de ultracongelamento a -80 °C, conforme metodologia descrita por Hunter-Cevera & Belt, (1996) e Kirsop & Doyle (1991).

Os isolados foram mantidos no acervo de pesquisa da DRM até o início deste projeto, quando as bactérias foram reativadas nos respectivos meios de cultivo utilizados no isolamento, preparados com solução de água do mar artificial (ASW), para verificação da pureza e a avaliação das características morfológicas e coloração de Gram por microscopia óptica. Esse procedimento contou com a colaboração da Srta. Paula de França, na época, aluna de mestrado e membro do grupo de pesquisa da Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini.

4.2 Identificação dos isolados bacterianos por análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S

4.2.1 Extração e quantificação de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada segundo o protocolo descrito por Pospiech & Neumann (1995) modificado. Os isolados foram reativados em 5 mL do meio de cultivo utilizado no isolamento e incubados a 28°C por 24 h, a 150 rpm. O crescimento bacteriano foi coletado por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min em tubos 1,5 mL de polipropileno e as células foram homogeneizadas em 0,5 mL de tampão SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM em pH 7,5). Foram adicionados 1 mg/mL de lisozima e os tubos incubados a 37 °C por 60 min. Posteriormente, foi adicionado 1/10 de volume de SDS 10 % e 0,5 mg/mL de proteinase K e incubados a 55 °C por 2 h, com inversões ocasionais dos tubos. Foram adicionados 1/3 do volume de NaCl 5M e 1 volume de clorofórmio e incubados a temperatura ambiente por 30 min com inversões ocasionais. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000 rpm por 10 min e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e os tubos foram invertidos por várias vezes a fim de misturar as soluções ou até visualizar um precipitado fibroso branco. Os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min para precipitação do DNA genômico. O DNA genômico foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 70 % e centrifugado-se a 6.500 rpm por 3 min entre as lavagens. O DNA genômico foi mantido a temperatura ambiente ou em estufa a 37 °C para secagem.

A purificação do DNA foi realizada após a suspensão do sedimento em 200 µL de TE pH 8,0 acrescidos de 10 µL de RNase (5 mg/µL) e incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 20 µL de cloreto de lítio 4 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para remoção de proteínas. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA genômico foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA genômico foi lavado 2 vezes com etanol 70% centrifugando a 6.500 rpm por 3 minutos entre as lavagens. Após secagem, o DNA genômico foi suspenso em 50 µL de água Milli Q e estocado a -20 °C.

O DNA genômico extraído foi quantificado por comparação com DNA λ em diferentes concentrações em gel de agarose 0,8% corado com 2 % de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) submetido à eletroforese por 30 min em condição de 80 V. Após sua quantificação, os DNA extraídos foram armazenados em tubos de polipropileno e mantidos a temperatura de 4°C.

4.2.2 Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, foi realizada com os *primers* p10f (5' AGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e p1525r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3'), similares às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias conforme descrito por Lane e colaboradores (1991). As condições de reação de amplificação foram: 0,4 μ M de cada *primer* específico, 1 mM tampão 10X, 0,2 μ M dNTP's, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 μ L de reação. Na amplificação foi aplicada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 min de desnaturação, 55 °C por 1 min de anelamento e 72 °C por 3 min de extensão, incluindo uma extensão final de 3 min a 72°C, em termociclador *Eppendorf*. O tamanho dos produtos de PCR foi confirmado por comparação com o marcador de peso molecular de 1 KB (Sigma) em gel de agarose 1,2% corado 2 % de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) submetido à eletroforese por 30 min em condição de 80 V.

Para o sequenciamento automatizado, os produtos de PCR foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA & gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem).

Os *primers* utilizados no sequenciamento foram 10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'), 765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3'), 782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3'), 1100r (5' AGG GTT GCG CTC GTT G 3') e 1525r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3'). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies) conforme recomendação do fabricante. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 96°C durante 2 min, seguida de 30 ciclos, sendo cada ciclo constituído das etapas de desnaturação (96 °C, 45 s), pareamento (50 °C, 30 s) e extensão (60 °C, 4 min). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Posteriormente, as reações de sequenciamento foram precipitadas, suspensas no tampão de corrida apropriado para cada sistema (10 µL do tampão formamida para o sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystems)).

As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), RDP Release 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) Kim et al., 2012). As sequências recuperadas dos bancos de dados foram alinhadas no programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), editadas no BIOEDIT (Hall, 1999) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA versão 6 (Tamura et al., 2013). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (Kimura, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi realizada empregando-se pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições (Felsenstein, 1985).

4.3 Obtenção de extratos brutos microbianos

O critério primordial para a seleção dos gêneros de isolados posteriormente submetidos a produção de extratos microbianos foi a pesquisa bibliográfica, selecionando gêneros de bactérias cuja literatura havia descrito algum potencial biotecnológico ou gêneros considerados endêmicos ao continente Antártico.

De início inoculou-se 100 µL de cada isolado selecionado (total de 22 isolados), em 10 mL de meio de cultura Nutriente Broth (OXOID®) com água do mar artificial (ASW) em tubos de ensaios individualizados. Os tubos de ensaios e o meio de cultura foram devidamente esterilizados. Após o inóculo, os tubos de ensaio foram incubados com agitação constante de 120 g a 20°C por 48 h. Em seguida todo volume final foi transferido para 50 mL de meio de cultura Nutriente Broth (OXOID®) e ASW em Erlenmeyer de 150 mL e incubados sob as mesmas condições, porém com tempo de incubação de 92 h. Após este período de incubação todo inóculo foi transferido, individualmente, para 500 mL de meio de cultura Nutriente Broth (OXOID®) com ASW em frascos de 1 L e incubados sob as mesmas condições por 116 h. Em seguida, os frascos foram incubados, sem agitação a 20 °C. Após este período procedeu-se a obtenção dos extratos brutos por meio da separação líquido-líquido.

Na extração líquido-líquido da cultura microbiana foi utilizado o acetato de etila como solvente. Para isso transferiu-se os 500 mL de cultura em um béquer de vidro de dois litros e adicionou-se 500 mL de acetato de etila, a suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um dispersor ULTRA TURRAX IKA T 18 Basic de alta performance, para homogeneização de volumes entre 1 e 1.500 mL na velocidade de 5.000 g por 3 minutos. Após a homogeneização de volumes, a suspensão foi transferida para um funil de separação com a finalidade de separar a fase orgânica da inorgânica. A fase inorgânica foi coletada em frasco de vidros de 1 L, e a fase orgânica (superior) transferida para balão de fundo redondo para descarte de resíduos químicos de acordo com as normas adequadas. O balão de fundo redondo foi colocado no rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi) a vácuo e temperatura de 40 °C, para a evaporação do solvente e recuperação do extrato bruto.

4.4 Ensaio da atividade antiviral

A avaliação da atividade antiviral dos isolados foi realizada sob orientação da Dra. Luciana Konecny Kohn, no Laboratório de Virologia Animal (LVA), IB, UNICAMP.

Para realizar esse ensaio antiviral utilizou-se a linhagem celular VERO, extraídas de rins de macacos, (Departamento de Virologia Clínica Göteborg University, Suécia) e o vírus HSV1 da cepa KOS (Faculdade de Farmácia da Universidade de Rennes, França), cultivados em meio mínimo de Eagle (MEM) (HIMEDIA[®]), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (HIMEDIA[®]). As culturas celulares foram mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. O estoque de vírus foi preparado, titulado com base no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973) e armazenado a -80° C. O vírus HSV-1, cepa KOS foi cedido pela Profa. Dra. Claudia Simões - UFSC.

As células da linhagem celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), extraídas de rins de bovinos, também foram utilizadas nesse trabalho e mantidas sob as mesmas condições da célula Vero, exceto que ao invés de soro fetal bovino, utilizou-se 10% de soro equino.

- **Multiplicação Viral**

As amostras virais (1 mL) foram inoculadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm², permanecendo durante 1 h a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Após este período, foram adicionados 9 mL de meio mínimo de Eagle (MEM) (HIMEDIA[®]) sem

SFB (HIMEDIA[®]) em cada garrafa de cultivo celular, voltando à incubação sob condições ideais descritas acima. Quando a monocamada apresentou 80% de efeito citopático (ECP), caracterizado por arredondamento e refringência das células, a garrafa foi congelada a -80 °C e, após ser descongelada, a mistura célula-vírus foi centrifugada e, o sobrenadante, distribuído em alíquotas em microtubos de 0,5 mL. O estoque de vírus foi preparado e titulado com base no método descrito por Reed & Muench (1938).

O vírus utilizado para o ensaio antiviral com a célula da linhagem MDBK é o vírus BVDV e a multiplicação viral seguiu o mesmo protocolo descrito para o vírus HSV-1.

- Titulação viral

As titulações virais foram sequenciais na base de 10 e inoculadas em volumes de 50 µL/orifício, em quadruplicata, em microplacas de cultivos celulares contendo 100 µL de células inoculadas com 24 h de antecedência. As placas infectadas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂. As leituras foram realizadas em 12, 24 e 48 h após a inoculação. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

As células foram distribuídas em placas de cultura de 96 micropoços, a uma densidade de 1×10^5 células / mL, e incubadas a 37 °C contendo 5% de CO₂ durante 24 h. As diluições em série de vírus preparados foram estocadas e as células foram infectadas com a diluição do vírus. Após 1 a 2 dias de incubação, o efeito citopático foi avaliado (BASTOS, et al., 2013).

- Ensaio Antiviral

O teste de atividade antiviral foi avaliado inicialmente em dose única do extrato bruto (50 µg/µL) frente à diferentes concentrações virais (Figura 3). O extrato foi considerado positivo quando apresentou inibição do efeito citopático maior que 97%. A atividade antiviral foi realizada após titulação dos vírus de acordo com metodologias usuais, ou seja, 50 µL de células na concentração de $1,5$ a $3,0 \times 10^4$ células/compartimento na presença dos extratos na concentração de 50 µg/µL em quadruplicata incubadas por 1 h, seguida da adição do vírus em diluições sequenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂. As leituras foram realizadas após 24 e 48 h em busca do Efeito Citopático (ECP) característico. Os

títulos foram calculados com base no método de Spearman e Karber (Lorenz e Bögel, 1973).

A avaliação ocorreu pela observação dos orifícios em microscópio à procura da ocorrência do efeito citopático. Considerando como resultado negativo a ocorrência de ECP e positivo na ausência do ECP isto é, o extrato inibiu a ação viral sobre a célula.

O índice de inibição viral (IIV) para cada concentração da substância foi calculado por meio da diferença entre o log do título do controle (C) e o log do título do tratado. Considerou-se como positivo se o IIV for igual ou acima de 1,5 log.

A porcentagem de inibição foi calculada através da fórmula:

$(PI) = (1 - T/C) \times 100$, onde T é o antilog dos títulos virais tratados (com extrato) e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). Considerar positivo a PI igual ou acima de 94%.

Os extratos que apresentaram inibição viral maior que 97% foram submetidos aos testes de ensaio colorimétrico de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide). Esse ensaio é importante porque permite a quantificação da viabilidade celular.

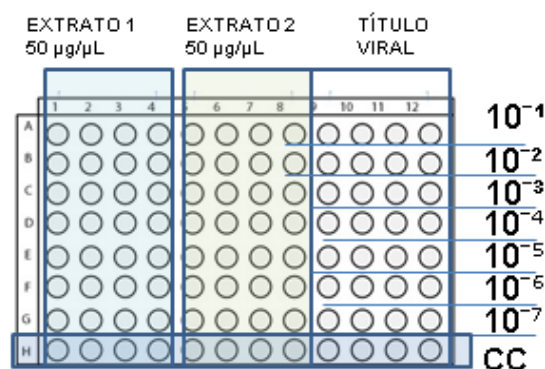


Figura 3. Imagem ilustrativa da montagem de microplacas com monocamadas de células para os ensaios de atividade antiviral.

Os extratos microbianos avaliados foram diluídos em DMSO a fim de obter todos na mesma concentração de 50 µg/µL que foram testados em diluições de 10^{-1} a 10^{-7} da concentração viral. CC é o controle celular, onde apenas inoculou-se no orifício extrato microbiano, sendo ausente do inóculo de vírus. O cc é utilizado para verificar a toxicidade do extrato na célula.

- Determinação da Concentração do crescimento celular (CC_{50}) e da Concentração da Inibição do crescimento viral (IC_{50})

A IC_{50} corresponde a concentração do extrato que é capaz de inibir 50% da replicação viral e o CC_{50} corresponde a concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento celular.

- CC_{50} - Concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento celular

Para determinar a concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento celular, colocou-se 100 μ L/orifício de células em microplacas de 96 orifícios, preparadas 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Com as células confluentes, foram inoculados 100 μ L/orifício do extrato, em diluição sequencial na base 2, incubando-se a microplaca em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade durante 48h. Após este período, realizou-se o ensaio colorimétrico MTT.

O meio foi descartado e foram adicionados 20 μ L da solução de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), a uma concentração de 5 mg/mL, em cada orifício das placas. Essas placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 3 h. Em seguida o sobrenadante de cada orifício foi retirado cuidadosamente, com micropipetas multicanal, posteriormente houve a adição de 150 μ L de DMSO para a dissolução dos cristais formados, o que permitiu a posterior leitura da absorbância. A taxa de redução do tetrazolium corresponde à taxa de células viáveis, metabolicamente ativas. As placas foram, em seguida, colocadas em agitação por 10 min e, por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Gerlier & Thomasset, 1986). A partir desses dados os índices IC_{50} e CC_{50} foram gerados através de uma análise de regressão linear.

- IC_{50} - Concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento viral

Para determinar a concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento viral, colocou-se 100 μ L/orifício de células em microplacas de 96 orifícios, preparadas 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade. Com o tapete formado, foram inoculados 100 μ L/orifício do extrato, em diluição sequencial na base 2, 50 μ L/orifício do vírus na concentração de 10 Doses Infectantes (DI), incubando-se a

microplaca em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 100% de umidade durante 48h. Após este período, realizou-se o ensaio colorimétrico MTT.

O meio foi descartado e foram adicionados 20 µL da solução de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), a uma concentração de 5 mg/mL, em cada orifício das placas. Essas placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 3 h. Em seguida o sobrenadante de cada orifício foi retirado cuidadosamente, com micropipetas multicanal, posteriormente houve a adição de 150 µL de DMSO para a dissolução dos cristais formados, o que permitiu a posterior leitura da absorbância. A taxa de redução do tetrazolium corresponde à taxa de células viáveis, metabolicamente ativas. As placas foram, em seguida, colocadas em agitação por 10 min e, por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Gerlier & Thomasset, 1986). A partir desses dados os índices IC₅₀ e CC₅₀ foram gerados através de uma análise de regressão linear.

- Determinação do índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade expressa a segurança para a utilização da substância testada *in vitro*, podendo viabilizar a realização de outros ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Coen & Richman, 2007; Dezengrini *et al.*, 2009). Os valores de IS são considerados positivos a partir de 4, e quanto maior é esse valor, considera-se o extrato como mais promissor (Amoros *et al.*, 1992).

O cálculo de índice de seletividade é utilizado para analisar se os extratos que se apresentaram ativos são promissores para a síntese de futuros medicamentos. Para isso, calcula-se a concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento celular (CC₅₀) e divide-se pela concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento viral (IC₅₀). As placas são montadas de acordo com a Figura 4.

$$IS = CC_{50} / IC_{50}$$

O IS foi calculado por análise de regressão linear, considerando-se a equação da reta adequada quando o valor de R² foi igual ou superior a 0,9. Este valor é utilizado para estimar a segurança de medicamentos, tanto para a utilização em humanos, quanto para animais, sendo que quanto maior o valor do IS maior será a segurança do fármaco (Dezengrini *et al.*, 2010).

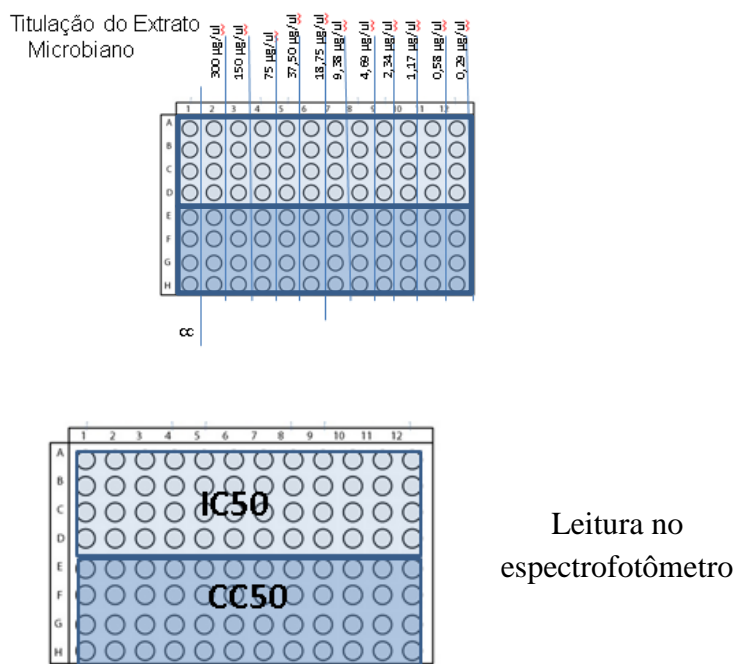


Figura 4. Imagem ilustrativa da montagem da microplaca para determinação e leitura do índice de seletividade (IS).

Na Figura 4 é possível observar que a primeira coluna encontra-se o controle de células (CC) tanto para a determinação do IC₅₀ como para a determinação do CC₅₀, ou seja, todos os orifícios da coluna 1 da microplaca apresenta apenas o tapete de monocamada celular e o Meio Mínimo de Eagle (MEM^{HIMEDIA®}).

- Mecanismos de ação do vírus

Para a avaliação da fase do ciclo viral em que cada extrato pode interferir, foram realizados experimentos com diferentes tratamentos.

- **Ensaio de inativação da partícula viral:** as amostras virais foram incubadas por 1 h com os extratos microbianos, na ausência de células, para avaliar a capacidade de provocar inativação da partícula viral, assim não iniciando a replicação viral. Após este período realizou-se uma diluição seriada e 100 µL foi adicionado na placa que continha a monocamada celular confluenta.

- **Ensaio da inibição da replicação viral:** as células foram infectadas com vírus e tratadas com os extratos na concentração de 100 µg/µL durante 1 h. Essa temperatura

utilizada permite que ocorra a adsorção viral, mas não a penetração do vírus na célula. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, as placas foram lavadas com PBS, foram adicionados 150 µL de MEM com 1% de soro fetal bovino e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, tempo necessário para a penetração das partículas virais e continuidade do processo de replicação.

- **Ensaio da inibição da adsorção viral:** as células foram incubadas com os extratos microbianos inicialmente por 1 h a 37 °C. Após este período, foi inoculado o vírus. A temperatura de incubação foi de 37° C por 48 h.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade e caracterização dos isolados

A coleta realizada na Baía do Almirantado (Ilha Rei George), Antártica, durante expedição pelo Programa Antártico Brasileiro no verão de 2010 na Estação Brasileira Comandante Ferraz resultou no isolamento de 153 bactérias, as quais foram mantidas na coleção de pesquisa da Divisão de Recursos Microbianos (DRM). Dentre esses 153 isolados, 145 resistiram à criopreservação e foram reativados em placas de petri descartáveis, preparadas com meio de cultura Nutrient Agar (NA) e solução de água do mar artificial (ASW). Após plaqueamento dos isolados esses foram incubados em uma câmara incubadora a temperatura de 20 °C.

As características morfológicas das colônias de bactérias foram confirmadas por meio de microscopia óptica e agrupadas em Gram positivas e Gram negativas. De acordo com os resultados, a caracterização morfológica confirmou algumas características dos principais Filos identificados posteriormente pelo sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

A Figura 5 ilustra a distribuição dos isolados agrupados em Filos, bem como a frequência de ocorrência dos isolados nesses Filos revelados pelo sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. O grupo mais abundante foi o Filo Proteobacteria (67%), seguido de Firmicutes (21%), Actinobacteria (9%) e Bacteroidetes (3%). Esse resultado apresentou dados semelhantes aos obtidos por Fan e colaboradores (2013) para a mesma região geográfica desse estudo.

Fan e colaboradores (2013) analisou a diversidade microbiana coletando amostras de sedimentos lacustres, sedimentos marinhos e solos ornitogênicos da Ilha de Rei

George, Antártica. Neste estudo foram aplicadas as estratégias dependente e independente de cultivo para investigar a diversidade genética. No método dependente de cultivo foram obtidos 70 isolados, 49 Gram negativos e 21 Gram positivos, os quais foram classificados em 5 Filos após sequenciamento do gene RNA ribossomal 16SrRNA; 54,3% de Gammaproteobacteria, 34,3% de Firmicutes, 5,7% de Actinobacteria, 4,3% de Bacteroidetes e 1,4 de Betaproteobacteria. Dentre esses 5 Filos foram identificados 12 gêneros, 38 pertencem a Proteobacteria sendo que desses 38, 22 são do gênero *Pseudomonas*, 4 do gênero *Psychrobacter*, 3 *Shewanella*, 5 *Acinetobacter* e 1 *Moraxella*. O Filo Actinobacteria apresentou isolados do gênero *Arthrobacter*. O Filo Firmicutes do gênero *Bacillus*, *Sporosarcina* e *Planococcus* e por fim o Filo Bacteroidetes do gênero *Flavobacterium* e *Cytophaga*. Pela estratégia independente de cultivo utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), as amostras foram classificadas em Proteobacteria (Beta, Gamma e Alphaproteobacteria), Bacteroidetes, Firmicutes, Chlorobi e Denoicoccus-Thermus.

Os resultados apresentados neste estudo revelaram a ocorrência de grande diversidade bacteriana obtida a partir de isolamento de sedimento e associada a organismos marinhos. Foram recuperados 28 gêneros distintos distribuídos em cinco Filos (Tabela 1). O Filo Proteobacteria ficou representado por 12 gêneros, sendo o mais abundante o gênero *Psychrobacter* com 38 isolados identificados, representando 39,18%, seguido pelo gênero *Pseudomonas* com 16 isolados identificados, representando 16,49% e o gênero *Planococcus*, pertencente ao Filo Firmicutes com 12 isolados, representando 40 %. Estes micro-organismos também foram isolados nos estudos de Fan e colaboradores (2013). Outros gêneros em comum foram *Bacillus*, *Shewanella* e *Arthrobacter*, entretanto, não foram recuperados espécimes dos gêneros e *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*. Por outro lado, outros gêneros não isolados no estudo de Fan e colaboradores (2013), como *Pseudoalteromonas*, *Enterobacter*, *Marinobacter*, *Salinibacterium* e *Saccharopolyspora* foram recuperados dos organismos marinhos. Esta diferença pode estar relacionada aos diferentes meios utilizados nas estratégias dependentes de cultivo utilizadas nos dois estudos, ou variações de microclimas nos quais sedimentos foram coletados, idade do solo, características físicas e químicas do solo, impactos ambientais, entre outros fatores. Além disso, a maior diversidade encontrada nos organismos marinhos pode estar

relacionada também às associações simbióticas favorecendo os organismos envolvidos, o que não está presente nos sedimentos.

Muitos esforços tem sido aplicado para isolar novas espécies microbianas visando a busca de novos compostos para aplicação em diferentes segmentos da indústria farmacêutica, petrolífera, agrícola, de alimentos, entre outras. A diversidade microbiana em diferentes habitats vem sendo explorada, principalmente, por meio de estratégia independente de cultivo e novas espécies são constantemente reveladas aumentando significativamente o número de possíveis espécies no planeta. Entretanto, muitas destas espécies nem sequer foram isoladas e, conseqüentemente, não foram descritas e exploradas biotecnologicamente (Wulfschleger et al., 2015).

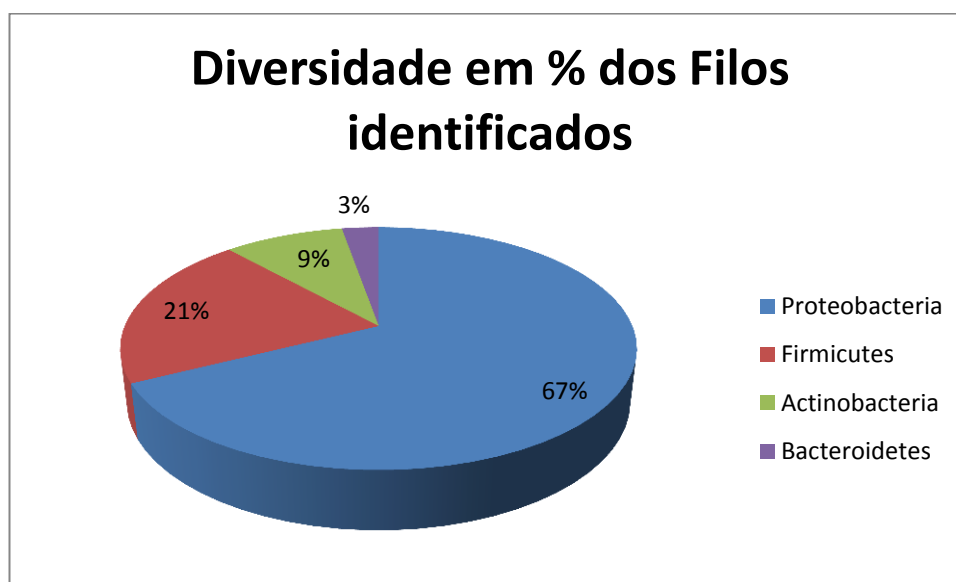


Figura 5. Abundância dos Filos identificados nas amostras coletadas da Baía do Almirantado, Ilha de Rei George, Antártica.

Tabela 1. Número dos isolados de bactérias recuperados de macro-organismos marinhos e amostras de sedimento coletados no continente Antártico e identificados por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

Filo	Gênero	Macro organismos marinhos							Total*
Proteobacteria		PP⁽¹⁾	OUR⁽²⁾	ESP⁽³⁾	ASC⁽⁴⁾	S⁽⁵⁾	SAP⁽⁶⁾	LIQ⁽⁷⁾	
	<i>Enterobacter</i>	8					2		10
	<i>Escherichia</i>	1		3					4
	<i>Marinobacter</i>					6			6
	<i>Marinomonas</i>	1		1			1		3
	<i>Pantoea</i>	1							1
	<i>Pseudoalteromonas</i>	2		1		6			9
	<i>Pseudomonas</i>	2	2		1	5	2	4	16
	<i>Psychrobacter</i>	4		2	5	27	1		39
	<i>Shewanella</i>	3							3
	<i>Stenothrophomonas</i>	2							2
	<i>Sulfitobacter</i>	2				1			3
	<i>Thalassomonas</i>					1			1
Total**		26	2	7	6	46	6	4	97
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	2				1			3
	<i>Carnobacterium</i>			2	3				5
	<i>Marinilactibacillus</i>			4	2				6
	<i>Planococcus</i>					12			12
	<i>Staphylococcus</i>	4				1			5
Total**		6		6	5	14			31
Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>					2			2
	<i>Kocuria</i>					1			1
	<i>Arthrobacter</i>					1			1
	<i>Dietzia</i>	1							1
	<i>Salinibacterium</i>	2				1			3
	<i>Curtobacterium</i>	1							1
	<i>Rodhococcus</i>					1			1
	<i>Saccharopolyspora</i>	2							2
	<i>Micrococcus</i>	1							1
Total**		7				6			13

Tabela 1. Número dos isolados de bactérias recuperados de macro-organismos marinhos e amostras de sedimento coletados no continente Antártico e identificados por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

Bacteroidetes	<i>Zobellia</i>				1	2			3
	<i>Algoriphagus</i>					1			1
Total**					1	3			4

PP⁽¹⁾= Algas. **OUR**⁽²⁾= Ouriço do mar. **ESP**⁽³⁾= Esponja. **ASC**⁽⁴⁾= Ascídia. **S**⁽⁵⁾= Sedimento. **SAP**⁽⁶⁾= Salpa. **LIQ**⁽⁷⁾= Líquens.

Chong e colaboradores (2013) investigaram a diversidade bacteriana do continente Antártico em 13 pontos do continente, entre eles dois pontos de coleta da região Subantártica, quatro pontos na Antártica-Marítima e sete pontos na Antártica Continental. Foram identificados 2.089 isolados por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S, dentre esses os gêneros de maior ocorrência (37%) foram: *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*.

Nos três estudos, os gêneros comuns no continente Antártico foram *Psychrobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. O gênero *Psychrobacter* inclui 34 espécies que crescem em baixas temperaturas, sendo que muitas espécies desse gênero foram isoladas na Antártica como *P. frigidicola* isolada de solos ortogênicos (Bowman et al., 1996), *P. glacincola*, isolada do gelo presente no mar da Antártica (Bowman et al., 1997), *P. fozii* encontrado em diversos locais da Antártica (Bozal et al., 2003), *P. luti* isolada na lama glacial da Antártica (Bozal et al., 2003), *P. aquaticus*, isolada do ambiente marinho da Antártica (Shivaji et al., 2005), entre outras espécies. Portanto, a maior incidência desse gênero está relacionada a tolerância que esses micro-organismos apresentam para sobreviver em ambientes com baixas temperaturas.

O gênero *Arthrobacter* está distribuído globalmente nas comunidades bacterianas do solo e no continente Antártica, e pode ser encontrado também em habitats como lagoas e rochas (Reddy et al., 2002; de la Torre et al., 2003; Peeters et al., 2011) *apud* Chong et al., (2013). Sendo assim, o isolamento e identificação desse gênero não representou fato inédito.

Pseudomonas é outro gênero amplamente distribuído, sendo encontrado em solos, gelos, lagos, entre outros. Relacionadas ao ambiente marinho foram descritas as espécies, *P. alcaliphila*, espécie psicrófila alcalófila isolada da água do mar (Yumoto et al., 2001), *P. antarctica* isolada do sul da Antártica (Reddy et al., 2004) e *P. marincola* (Romanenko et al., 2008).

Apesar de algumas diferenças, pode-se dizer que de uma forma geral as comunidades bacterianas do solo identificadas no continente Antártica, até o presente momento, estão compostas majoritariamente por bactérias psicrotolerantes mesofílicas. Porém a diversidade microbiana desse continente ainda é pouco estudada e alguns obstáculos precisam ser superados para se conhecer mais a ecologia e a diversidade da microbiota local. Ainda é complexo conhecer plenamente as espécies microbianas endêmicas na Antártica, a abundância de espécies psicrófilas, as interações ecofisiológicas dessas com o meio ambiente e macro-organismos e os padrões de distribuição biogeográficos da diversidade dessas comunidades. Esses problemas possivelmente podem ser amenizados aumentando-se o número de pontos de coletas, associando-se informações de dados obtidos por métodos dependente e independente de cultivo, utilizar tecnologias de última geração e estudar regiões diversas do continente (Chong et al., 2013).

Os resultados desse trabalho mostram a diversidade e semelhanças de gêneros microbianos identificados na Ilha de Rei George, Antártica com as de outros estudos também realizados na Antártica. É visto que alguns gêneros podem ser considerados como recorrentes da comunidade microbiana da Antártica, entretanto muito mais estudosse fazem necessários para se compreender e se conhecer melhor sobre essa diversidade, ainda tão pouco explorada.

5.1.1 Os macro-organismos e a diversidade bacteriana

A Tabela 1 relaciona os gêneros e o número de isolados recuperados dos macro organismos marinhos coletados na Ilha Rei George, Antártica, pertencentes a cada filo. O número total de bactérias na Tabela 1 corresponde a 142 bactérias, pois as bactérias oriundas da coleta de osso de baleia não foram consideradas na avaliação da diversidade bacteriana associada a macro-organismos marinhos. Foram isoladas e identificadas do osso de baleia 3 bactérias do gênero *Pseudomonas*, contabilizando um total de 145 isolados identificados. Analisando os dados observou-se que o maior número e

diversidade de isolados foi oriundo de algas (Tabela 1, Amostra PP). Observou-se também que dentre os isolados de algas, os filos de maior abundância foram *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, com 25, 7 e 4 isolados, respectivamente. As algas marinhas secretam substâncias ricas em carbono e energia propiciando condições para as bactérias se instalarem na sua superfície, podendo formar comunidade microbianas complexas. Essas comunidades podem ser tão complexas que não são compostas apenas por bactérias, mas também fungos, protozoários, esporos e larvas de invertebrados marinhos (Lachnit et al., 2009, 2011; Goecke et al., 2010; Burke et al., 2011) *apud* (Singh & Reddy, 2015).

As interações entre algas marinhas e bactérias são importantes para o crescimento e desenvolvimento de ambas. Os grupos de bactérias mais abundantes nas superfícies de algas marinhas são *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Essa abundância pode ser explicada pelo fato deles conseguirem suportar as diversas condições de estresse, serem extremamente eficientes no processo de crescimento, competição, otimização e conversão dos recursos disponíveis nas superfícies das algas para o crescimento e desenvolvimento de suas espécies (Singh & Reddy, 2015).

Segundo Singh & Reddy (2015), a diversidade da comunidade microbiana dessas interações não varia apenas entre as espécies, mas varia também temporalmente. Isso pode ser compreendido por estudos que mostraram espécies diferentes de algas, mas com o mesmo nicho ecológico e que abrigavam a mesma comunidade microbiana enquanto que as mesmas espécies de algas, mas em posições geográficas diferentes apresentaram associações com comunidades microbianas distintas. Por isso, apesar de muitos estudos revelarem como dominante a abundância de *Proteobacteria* e *Firmicutes*, não foi possível padronizar quais Filos são predominantes nas associações entre algas e micro-organismos. Além disso, há também registros na literatura que mostram essas variações da diversidade bacteriana, pois existem estudos que citam como predominantes os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, outros *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, outros ainda *Proteobacteria* e *Planctomycetes* (Singh & Reddy, 2015).

Uma nova espécie de Bacteroidetes, *Algitalea ulvae* sp. nov, foi isolada de alga verde *Ulva pertusa* (Yoon, Adachi, Kasai, 2015). Outra ocorrência desse filo pode ser observada na associação de *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov. isolada de alga marinha vermelha *Ahnfeltia tobuchiensis* essa bactéria é capaz de degradar polissacarídeos de

algas marrons e vermelhas (Nedashkovskaya et al., 2014). Muitos outros exemplos de ocorrência e abundância de Bacteroidetes em algas marinhas podem ser citados.

A ausência do Filo Bacteroidetes nesse estudo pode ter sido um fato atípico, pois esse Filo pertence a família *Flavobacteriaceae* que está amplamente distribuída e encontrada na superfície de algas marinhas verdes. Embora a predominância dos isolados de algas desse estudo (Tabela 1, amostra PP) pertença aos Filos Proteobacteria e Actinobacteria e não ao Filo Bacteroidetes esse resultado pode ser compreendido devido à dificuldade de isolar membros dessa família por método cultura-dependente (O'Sullivan et al., 2006) *apud* Yoon et al., (2015). Sendo assim fica evidente que a ausência de Bacteroidetes oriundos de algas marinhas nesse estudo não é argumento para eliminar a possibilidade de ocorrência desses micro-organismos em associações com algas marinhas da ilha de Rei George, Baía Almirantado, Antártica.

As diferenças dessa diversidade na comunidade microbiana citadas acima podem ser explicadas pela variação da sazonalidade que influencia diretamente a diversidade de microbiana e pelas habilidades próprias de cada espécie em serem boas competidoras, inclusive com aquelas já instauradas nas superfícies das algas. Outro aspecto também importante para essas diferenças seria a composição dos produtos metabólicos excretados pelas algas, pois eles causam estresses que podem selecionar apenas bactérias capazes de sobreviver e se desenvolver em determinadas condições (Sing & Reddy, 2015).

Deve-se observar que além das diferenças citadas acima, existem vários outros fatores e mecanismos ainda pouco conhecidos sobre as associações entre as algas e as comunidades microbianas que nelas se instauram. Por isso, seriam necessários mais estudos e investigações nessa área para uma melhor compreensão dessas associações.

Analisando os isolados oriundos de ouriço-do-mar (Tabela 1, Amostra OUR) constatou-se que foi isolada apenas uma bactéria do gênero *Pseudomonas*. Esse resultado pode ser compreendido pelo fato deste gênero ser composto por bactérias encontradas em diversos ambientes, inclusive componentes da flora de vários animais marinhos (Beleneva et al., 2015). Ouriço-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus* apresenta em sua flora intestinal 39 gêneros diferentes de micro-organismos, mas os predominantes são *Vibrio* e *Pseudomonas* (Nelson et al., 2010). Essa informação permite inferir que a linhagem de *Pseudomonas* isolada do ouriço-do-mar desse

trabalho pode ser uma bactéria componente da flora desse invertebrado marinho, mas para se confirmar essa informação serão necessários estudos complementares.

Os isolados de esponja (Tabela 1, Amostra ESP) foram identificados como pertencentes ao Filo *Proteobacteria* (7 isolados) e *Firmicutes* (6 isolados). As esponjas marinhas são elementos fundamentais para a comunidade bentônica mundial. Conhecidas pela enorme quantidade de micro-organismos associados à elas, estima-se que 35% da biomassa da esponja é composta por micro-organismos associados. Esponjas marinhas e seus micro-organismos apresentam intensa atividade metabólica e produzem compostos biologicamente ativos com aplicações farmacêuticas. Os micro-organismos associados às esponjas mais abundantes pertencem aos Filos *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Nitrospirae* e *Poribacteria* (Hentschel et al., 2012; Simister et al., 2012).

A diversidade de comunidades microbianas e suas associações com esponjas marinhas é uma das interações mais bem compreendidas, entretanto ainda há muito que se estudar. Dentre o filo *Proteobacteria* a associação de esponjas com *Psychrobacter* não é um fato desconhecido, pois esse gênero tem sido isolado de diversas espécies de esponjas marinhas, porém é uma descoberta recente e ainda pouco se conhece sobre essa interação e seus possíveis benefícios ou prejuízos.

Foi identificado que uma linhagem de *Psychrobacter* sp. isolada de esponja marinha *Stellata* sp. produz atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Li et al., 2008; 2009). Essa descoberta foi relevante, porém ainda são poucas as informações sobre os compostos antimicrobianos ativos e não há relatos sobre o potencial antiviral desse gênero. Por isso analisar a atividade anti-herpética dos isolados de *Psychrobacter* nesse estudo foi uma prioridade.

Os filos oriundos de ascídia foram *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, com 8, 4 e 1 isolado, respectivamente (Tabela 1, Amostra ASC), sendo possível observar que a maior abundância ocorreu no filo *Proteobacteria*.

As ascídias são animais invertebrados marinhos, podendo estar solitários ou em formações de colônias, apresentando diversas formas e cores. Elas apresentam compostos metabólicos com diversas aplicações biotecnológicas, inclusive de interesse farmacológico, mas ainda muito pouco se conhece sobre a diversidade microbiana associada a esses invertebrados (Ruppert et al., 2005). A compreensão desse assunto é fundamental, visto que a maioria dos compostos de interesses industriais produzidos

pelas ascídias não são oriundos dos invertebrados, mas sim dos micro-organismos associados a eles (Schmidt, 2014).

Estudos realizados por meio de método dependente e independente de cultura permitiram a descrição de bactérias do filo Firmicutes e Alpha-Proteobacteria como predominantes em associações com as ascídias *Molgula manhattensis*, *Botryllus schlosseri*, *Didemnum* sp. e *Botrylloides* (Tait et al., 2007). O gênero *Pseudoalteromonas*, descrito nesse trabalho, também foi identificado oriundo de ascídia da espécie *Halocynthia aurantium*, localizada na região litorânea de Peter, Japão. Os gêneros mais abundantes associados com essa ascídia são *Pseudolateromonas* e *Bacillus*, sendo *Pseudoalteromonas* o mais abundante (Romanenko et al., 2001).

O maior número de isolados em ascídia foi *Psychrobacter*. Esse resultado não foi inesperado, pois uma espécie nova, *Psychrobacter maricola* sp.nov. foi isolada de ascídia da espécie *Polysyncrator* sp. (Romanenko et al., 2002). É possível que a ocorrência de *Pseudomonas* associadas à ascídias seja um fato recorrente, pois há relatos das *Pseudomonas xanthomarina* e *Pseudomonas saccherophilia* terem sido isoladas de ascídia (Romanenko et al., 2005; Schuett et al., 2005;).

Até o presente momento os gêneros *Marinilactibacillus* e *Carnobacterium*, oriundos de ascídia nesse estudo, não foram identificados pela literatura como micro-organismos isolados de ascídias.

Apenas um isolado do gênero *Thalassomonas* foi identificado. As bactérias desse gênero podem ser isoladas de águas, sedimentos e animais marinhos (*Thalassomonas actinarius* e *Thalassomonas haliotis*), mas não há registros sobre a ocorrência dessas em ascídias.

Marinilactibacillus é um gênero recentemente descrito (Ishikawa et al., 2003), o qual possui apenas duas espécies descritas; *Marinilactibacillus piezotolerans* (Toffin et al., 2005) e *Marinilactibacillus psychrotolerans* (Ishikawa et al., 2003), isoladas de sedimentos marinhos e animais marinhos vivos e em decomposição, respectivamente.

Carnobacterium é um gênero recorrente em ambientes frios como o continente Antártica e várias espécies novas são oriundas desse continente como *Carnobacterium alterfunditum*, *C. funditum*, *C. iners* (Franzmann et al., 1993; Snauwaert et al., 2013), mas nenhuma bactéria dessa espécie foi isolada de ascídia. Sendo assim, esse estudo possivelmente representa o primeiro relato desse gênero em ascídia oriunda do continente Antártico.

Ainda pouco se conhece sobre a diversidade microbiana associada a macro-organismos, especialmente invertebrados marinhos. Na literatura não é recorrente a presença do Filo Bacteroidetes associados às ascídias. Apesar de ser um fato atípico, é possível encontrar a presença de *Reichenbachia agariperforans* associada com a ascídia *Cystodytes dellechiajei*. Essas ascídias são tunicatos coloniais bentônicos e estão distribuídas nos Oceanos Atlântico, Pacífico, Índico e Mar mediterrâneo (Garcia et al., 2007). Embora não se conheça a espécie de ascídia desse trabalho foi identificada a presença de *Zobellia* sp. associada a ela, isso é um resultado novo, pois não se encontra na literatura estudos sobre essa associação.

As bactérias isoladas de salpas desse estudo são pertencentes a um único filo, Proteobacteria (Tabela 1, Amostra SAP). As salpas são tunicatos pelágicos e membros bastante comuns da diversidade de zooplankton de ambientes polares. Esses animais se alimentam por filtração e diatomáceas são majoritárias na sua dieta (Harbou et al., 2011). Salpas são capazes de filtrar cianobactérias, e outras micropartículas (Shuterland et al., 2010).

A ocorrência de *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Marinomonas* e *Enterobacter* oriundas da salpa, pode ser devido a incorporação dessas bactérias pelo mecanismo de filtração do animal. Outra possibilidade é dessas bactérias estarem associadas com outros elementos da alimentação da salpa. *Psychrobacter vallis* e *Psychrobacter aquaticus* foram isolados de amostras de cianobactérias em diferentes corpos d'água na região Antártica (Shivaji et al., 2005). Isso pode explicar a ocorrência de *Psychrobacter* oriundas de salpa nesse estudo. Nenhum registro foi encontrado sobre a identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Marinomonas* e *Enterobacter* associadas a salpa, portanto, este estudo traz esta novidade sobre a comunidade bacteriana de salpas.

5.1.2 Principais características dos gêneros de bactérias identificados

Nesse estudo, o Filo Proteobacteria é representado por 12 gêneros dos quais o mais abundante foi o *Psychrobacter* com 39 isolados identificados seguido do gênero *Pseudomonas* com 16 isolados identificados. Desse modo dois gêneros foram selecionados para os estudos do potencial antiviral. Além disso, há relatos na literatura demonstrando o potencial biotecnológico destes gêneros tais como atividade antimicrobiana (Fondi et al., 2014) e atividade enzimática (Gratia et al., 2009).

O gênero *Marinobacter* pertence a classe Gammaproteobacteria, foi descrito em 1992 por Gauthier e colaboradores. Bactérias desse gênero são Gram-negativas e a morfologia das células é do tipo bacilo, extremamente tolerante às elevadas concentrações salinas e potenciais degradadoras de hidrocarbonetos. A primeira bactéria descrita desse novo gênero foi isolada de água do mar mediterrâneo, próxima a uma refinaria de petróleo (LIU et al., 2012). No presente estudo foram recuperados seis isolados de *Marinobacter*, todos a partir de sedimentos marinhos (Tabela 1). No estudo realizado por Liu e colaboradores (2012) também foram coletadas amostras de sedimentos de uma região da costa Antártica na Larsemann Hills (Terra Princesa Elizabeth, Leste da Antartica; 69°22'18.99" S, 76°22'27.99" E), onde uma nova espécie de *Marinobacter*, denominada de *Marinobacter antarcticus*, foi descrita. Isso mostra que esse gênero ocorre no continente Antártico e embora o número de isolados nesse trabalho sejam de poucos representantes foi possível confirmar a presença desse gênero na diversidade microbiana do continente Antártico.

O gênero *Marinomonas* foi descrito em 1984 por Landschoot e De Ley. São bactérias Gram negativas, com morfologia de bastonetes, capazes de utilizar glicerol e lactato como fonte de carbono (Gupta et al., 2006). Esse gênero produz L-amino-ácido oxidase, uma proteína que apesar de apresentarem estrutura química similar elas diferem na função biológica. Essas proteínas são flavoproteínas diméricas, mas é possível encontrar, em menor frequência, flavoproteínas monoméricas. Essas proteínas podem ser utilizadas como biosensores na indústria alimentícia, catalisadores de processos de biotransformação, separação de enantiômeros, anti-tumor e biofertilizante. Bactérias *Marinomonas mediterrânea* produzem essa enzima com função biológica antimicrobiana (Hossain et al., 2014).

Duas espécies novas foram isoladas de ambientes frios, semelhante ao continente Antártica, *Marinomonas arctica* e *Marinomonas polaris*.

Marinomonas arctica foi isolada de amostras de gelo marinho da bacia canadense no Oceano ártico (78° 23' 14''N 149 ° 06 ' 55'' W). As bactérias dessa espécie são psicrotolerantes, morfologia da colônia é de bastonetes e não pigmentadas, crescem entre 0-37°C, mas a temperatura ótima é entre 25-27°C, crescem em pH entre 6-9, são aeróbicas e produtoras de catalase e citocromo-oxidase (Zhang et al., 2008).

Marinomas polaris foi isolada de água marinha da Ilha Kerguelen, subantártica (50° 40'S 68° 25'E). São bactérias Gram negativas, crescem entre 4-37°C, formam colônias não pigmentadas (Gupta et al., 2006).

Sobre *Marinomonas polaris* não existem estudos publicados, até o presente momento, relatando possíveis aplicações biotecnológicas e compostos bioativos de interesse farmacológicos. Uma patente criada por PARK J K; HWANG Y J; KOO B G; et al., (2015) identificou uma nova linhagem de *Marinomonas arctica* capaz de degradar proteínas, resíduos de animais e purificar águas contaminadas.

O gênero *Stenothrophomonas* foi descrito em 1993 por Palleroni & Bradbary. Essas bactérias podem ser encontradas em solos, ambientes aquáticos, ambientes extremos, associadas com plantas e em ambientes hospitalares. Apresentam considerável importância ecológica, pois auxiliam as plantas no controle de infestações por fungos. Também podem ser utilizadas para processos de biorremediação (Binks et al., 2005) *apud* Wolf et al., (2002). As diferentes espécies de *Stenothrophomonas* apresentam diferentes capacidades halotolerantes e diferentes temperaturas ótimas de crescimento (Wolf et al., 2002).

Coletas de sedimentos do solo da região leste da Antártica mostraram a presença de *Stenotrophomonas rhizophila* (Tomova et al., 2014). Nesse estudo os isolados identificados desse gênero foram isolados de algas, isso é uma informação nova, visto que ainda não há relatos sobre associações desse micro-organismo com algas marinhas na Antártica. Relatos na literatura sobre esse gênero revelam seu potencial de biorremediação, porém nenhuma informação sobre o potencial antiviral das espécies foi encontrada. O gênero *Sulfitobacter* foi descrito por Sorokin em 1996, atualmente existem 15 espécies descritas. Esse gênero é abundante em ambientes marinhos e associações com bactérias isoladas do fitoplâncton da Antártica (Ghiglione et al., 2012; Ghiglione and Murray 2012; Jamieson et al., 2012) *apud* Zeng et al., (2014). Os três isolados desse estudo são dois oriundos de algas e um de sedimento.

A aplicação biotecnológica de *Sulfitobacter* foi recentemente relatada Romanenko e colaboradores (2013). O estudo revelou a atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Escherichia faecium* (Romanenko et al., 2013). Atualmente existem 9 espécies descritas do gênero *Thalassomonas*, as quais são encontradas em ambientes marinhos e associadas a macro-invertebrados marinhos. O potencial biotecnológico desse gênero é pouco explorado, mas elas apresentam atividade degradadora de ágar

(Ohta et al., 2005). Nesse estudo foi identificado apenas 1 isolado do gênero *Thalassomonas* obtido de da amostra de ascídia. Antes de 1995 *Pseudoalteromonas* era classificado como pertencente ao gênero *Alteromonas*, após um estudo filogenético Gauthier e colaboradores (1995) dividiram o gênero em *Pseudoalteromonas* e *Alteromonas*. No ano de 1997 Bonzal e colaboradores descreveram uma nova espécie, *Pseudoalteromonas antarctica*, isolada de sedimentos da baía de Almirantado, Ilha do Rei George. *Pseudoalteromonas antarctica* são bactérias Gram negativas, não pigmentadas que crescem a temperaturas entre 4°C a 30°C e pH entre 6 a 9,5 (Bozal, et al., 1997).

Um estudo intitulado de “Microorganisms belonging to *Pseudoalteromonas* genus, useful as agent antiviral against pathogen viruses that produce infectious diseases in marine crustaceans” gerou uma patente de número JP3143675-B1; JP2001224363-A. Essa informação indica que *Pseudoalteromonas* são micro-organismos produtores de compostos bioativos antivirais.

Outro estudo realizado por Al-Nahas e colaboradores (2011) avaliaram a produção de um exopolissacarídeo (EPS) como agente antiviral contra o herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1) de uma *Pseudoalteromonas* sp. isolada de esponja marinha e obtiveram resultado positivo. Ainda é necessário aprofundar mais os estudos sobre as características químicas do EPS, mas é uma evidência de que esse gênero pode produzir compostos bioativos no combate ao HSV-1.

Shewanella é um gênero ubíquo descrito por MacDonell and Colwell (1986), encontrado em ambientes marinhos, vertebrados e invertebrados marinhos, amostras clínicas, fluidos de campos petrolíferos, lodo ativado, gelo da Antártica entre outros ambientes. *Shewanella arctica*, isolada de sedimento da Antártica e descrita por Kim et al., (2012), é uma espécie psicrotolerante que cresce entre 4 °C a 28 °C, mas a temperatura ideal para ele é de 20°C, pH de crescimento entre 4,5 a 9 são redutoras de ferro. Não há na literatura, até o presente momento, registros de compostos bioativos com propriedades antivirais derivados desse gênero, mas *Shewanella algae* mostrou ter um potencial antimicrobiano contra *E. coli* (MTCC 40), *E. cloacae*, *P. vulgaris* (MTCC 426), *S. typhii* (MTCC 98), *Vibrio* sp (RACHANAMOL et al., 2014). O filo Firmicutes é representado por 5 gêneros distintos; *Planococcus*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Marinilactibacillus* e *Staphylococcus*. No Tabela 1 é possível observar o número de isolados de cada gênero obtidos neste estudo.

O gênero *Marinilactibacillus* é um gênero relativamente novo, isolado de organismos marinhos, descrito em 2003 por Ishikawa e colaboradores. As bactérias desse gênero são produtoras de ácido láctico, Gram positivas, psicrotolerantes, apresentam um bom crescimento em temperaturas entre 1 °C a 8 °C, com crescimento ótimo para temperaturas entre 37 - 40°C, a temperatura máxima que suportam é de 45 °C (ISHIKAWA, 2003). Atualmente esse gênero apresenta apenas 2 espécies descritas; *Marinilactibacillus piezotolerans* (Tofin et al., 2005) e *Marinilactibacillus psychrotolerans* (Ishikawa et al., 2003). Ambas as espécies foram isoladas de ambientes marinho, indicando que podem ser endêmicas de ambientes marinhos.

Até o presente momento não se encontra na literatura científica estudos que revelam o potencial antiviral dessas espécies. Embora poucos estudos com possíveis aplicações biotecnológicas tenham sido divulgados com esse gênero, isso não elimina a possibilidade de apresentar bioativos com relevância farmacêutica.

Carnobacterium é um gênero que apresenta 9 espécies descritas, são produtores de ácido láctico e de bastante interesse na indústria alimentícia. São isolados de ambientes frios, tolerantes ao congelamento, crescem a baixas temperaturas e são capazes de suportar elevadas condições de pressão (Leisner, 2007).

Em 1991 foram descritas duas novas espécies, *Carnobacterium funditum* e *Carnobacterium alterfunditum*, isoladas da água de Vestfold Hills, Antártica. Essas bactérias são Gram positivas, produtoras de ácido láctico, psicotróficas, não crescem na temperatura de 30 °C, quando submetidas a temperaturas de 20 °C crescem melhor em condições anaeróbicas do que aeróbicas (Franzmann., Weiss, Tindall, 1991). Não há relatos na literatura a respeito de compostos bioativos com propriedades antivirais produzidos por espécimes desse gênero.

O filo Bacteroidetes foi o menos abundante, dentre os isolados, com apenas 4 isolados; 3 do gênero *Zobellia*, sendo 2 isolados de sedimento marinho e 1 de Ascídia, e 1 do gênero *Algoriphagus* que foi isolado de sedimento marinho.

O gênero *Zobellia* foi descrito em 2001 por Barbeyron e colaboradores. São bactérias Gram negativas, encontradas em ambientes marinhos, formam colônias de coloração amarelo-laranja, crescem entre 4 °C a 35 °C, são capazes de degradar ágar. Na literatura a aplicação biotecnológica de compostos desse gênero é apenas na degradação de ágar e carragenina (Hatada et al., 2011).

O gênero *Algoriphagus* foi descrito em 2003 por Bowman e colaboradores, isolado de gelos marinhos e lagos salinos. A espécie *Algoriphagus antarcticus* foi isolada dos Lagos Reid, Fryxell e Ace, Antártica e identificada por Van Trapen e colaboradores (2004). As bactérias dessa espécie são Gram negativas, quimioheterotróficas, psicrófilas, aeróbicas, as colônias apresentam coloração laranja avermelhado, crescem em temperaturas entre 5 - 25°C e temperatura ótima em 20 °C (Trapen et al., 2004).

Algoriphagus antarcticus, foi isolada de amostras do solo na ilha de Rei George, Antarctica, produzem proteases extracelulares que podem ser de interesse biotecnológico nas indústrias alimentícias, têxtil, na produção de detergentes e na biorremediação (incluir referências). Atualmente esse é o único indício de compostos bioativos descrito para o gênero. O filo Actinobacteria foi o terceiro filo com maior número de isolados neste estudo. Esse filo é de grande importância para a saúde pública e indústria farmacêutica, pois 70 % dos compostos naturais de uso clínico comercializados atualmente são derivados de bactérias pertencentes a esse filo. Os gêneros que apresentam maior potencial de produtos naturais comercializados são *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Marinispota*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces* e *Verrucosipora*. Dentre esses *Streptomyces* é o que apresenta maior número de produtos naturais (Manivasagan et al., 2014).

Actinobactérias marinhas são largamente distribuídas, encontradas nas águas costeiras, sedimentos marinhos, associadas com peixes, algas, moluscos e esponjas, e também em ambientes como o mangue. Actinobactérias oriundas de ambientes marinhos e de ambientes extremos como Antártica ainda são pouco exploradas quando comparadas com as de ambientes terrestres. Uma análise geográfica da origem dos compostos ativos de Actinobacterias mostra que 67% são provenientes da Austrália, Caribe, Mediterrâneo, Japão, Oceano Pacífico Ocidental e Oceano Índico (Blunt et al., 2007) *apud* Manivasagam et al., (2013). Isso mostra que os estudos envolvendo bactérias isoladas da Antártica são fundamentais, pois além das condições a que estão submetidas serem diferentes, muito pouco se conhecesse sobre sua microbiota, o que aumenta a possibilidade de descobrir novos compostos biologicamente ativos.

Esse filo apresenta compostos biologicamente ativos de estruturas variadas como: alcaloides, terpenóides, quinonas, macrolídeos, indol, metilpiramídina, sisomicina,

éster, triazolpirimidina, metilpirimidina, entre outros. Todas essas variedades estruturais dos compostos químicos também apresentam diferentes aplicações como atividade antimicrobiana, anticâncer, antitumor, antiviral, anti-inflamaótria e antimalária (Manivasagan et al., 2014).

Apesar dessas descobertas mostrarem que as estruturas dos compostos naturais de actinobacterias marinhas diferem das terrestres e que apresentam bastante aplicações farmacológicas, ainda são poucos compostos isolados e identificados que apresentam atividade antiviral. Por isso é de suma importância investigar cada vez mais o potencial dessas bactérias na produção de compostos antivirais.

Após identificar e agregar os isolados de acordo com os Filos e gêneros pertencentes, foram realizadas as análises filogenéticas com sequências de isolados do mesmo gênero para aumentar a resolução da análise na identificação dos isolados.

A seguir foram selecionados os gêneros considerados de maior interesse para a investigação do potencial antiviral. É necessário saber que os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Enterobacter* (10 isolados), *Staphylococcus* (5 isolados) e *Escherichia* (4 isolados) foram desconsiderados para a produção dos extratos microbianos, visto que esses não eram de interesse do estudo.

A seleção dos gêneros para a investigação antiviral foi baseada em um levantamento bibliográfico, onde foi possível identificar os gêneros que apresentavam o maior potencial com aplicações farmacológicas.

De acordo com esses dados obtidos, foram selecionados os gêneros *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Planococcus*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Salinibacterium*, *Arthrobacter* e *Rodhococcus* para análise filogenética, produção de extratos microbianos e ensaio antiviral.

5.1.3 Identificação dos isolados bacterianos por análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S

Visando conhecer a identidade dos isolados foram obtidas sequências do gene RNA ribossomal 16S após a amplificação e sequenciamento para inferência filogenética e seleção dos isolados para o ensaio antiviral. Cabe ressaltar que buscou-se obter o maior número possível de pares de bases, porém os tamanhos dos fragmentos de DNA sequenciados variaram entre 1.100 a 1.300 (pb), sendo assim, o *cutoff* dos fragmentos analisados foi de 1.000 pb.

5.1.3.1 Gênero *Psychrobacter*

O gênero *Psychrobacter* pertence à Família Moraxellaceae, Ordem Pseudomonales, Classe Gammaproteobacteria. São bactérias Gram-negativas, osmotolerantes, piscicrófilas ou piscicrotolerantes; suas células apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes curtos, estritamente aeróbio, sem capacidade de locomoção, capazes de crescer entre 10 - 42 °C e são isolados de águas frias, profundezas e geleiras (Junni , Heym, 1986). Esse gênero é endêmico de regiões salinas frias. Muitas espécies novas foram e ainda têm sido descritas, pelo fato de regiões extremas como o ambiente Antártico ser pouco estudado, por outro lado, também muito pouco se conhece sobre o potencial biotecnológico desse gênero.

A análise filogenética (Figura 6) indicou que os isolados ANT 08, ANT 13, ANT, ANT 31, ANT 36, ANT 51, ANT 71, ANT 75, ANT 78, ANT 79, ANT 83, ANT 84, ANT 106, ANT 109, ANT 110 ANT 117, ANT 121, e ANT 123 provavelmente pertencem a mesma espécie, identificada como *Psychrobacter cibarius*.

Psychrobacter cibarius é uma espécie que foi descrita por Jung et al., (2005). Essa espécie foi isolada de uma culinária coreana tradicional que utiliza diversos frutos do mar fermentados. Também foi encontrada no trato digestivo de peixe da espécie *Salmo Salar L* (Ringo et al., 2008). Há poucas referências sobre essa espécie e até o presente momento não existe nenhuma evidência do potencial de bioprospecção para *Psychrobacter cibarius*, por isso investigar o potencial antiviral dessa espécie pode aumentar a probabilidade de se identificar e isolar novos compostos bioativos.

Os isolados ANT 29 e ANT 86 provavelmente devem pertencer à espécie identificada como *Psychrobacter fozii* (Figura 6). *Psychrobacter fozii* foi isolada do ambiente Antártico e descrito por Bozal et al., (2003). Ainda não há relatos sobre os possíveis potenciais de bioprospecção dessa espécie.

O isolado ANT 14 foi identificado como um *Psychrobacter maritimus* (Figura 6). Essa espécie foi isolada do gelo e de sedimentos do mar do Japão, descrita por Romanenko e colaboradores (2005). Representantes desta espécie são conhecidos como produtores de polissacarídeos, os quais desempenham diferentes funções e com aplicações diversas na indústria (Kondakova et al., 2012).

Os isolados ANT 04, ANT 20, ANT 26, ANT 32, ANT 34, ANT 39, ANT 41, ANT 73, ANT 93 e ANT 119 foram agrupados juntamente com as espécies *Psychrobacter piscatorii* e *Psychrobacter nivimaris*, sendo então identificado como *Psychrobacter* sp..

Enquanto que os isolados ANT 15, ANT 21 e ANT 24 agruparam com *Psychrobacter aquimaris*. Os isolados ANT 67 e ANT 97 não agruparam com nenhuma espécie na análise filogenética e, portanto, foram identificados como *Psychrobacter* sp. (Figura 6).

Alguns estudos revelam que o potencial biotecnológico do gênero está relacionado à produção de esterases (WU, G., et al., 2013) e de biosurfactante (Rizzo, et al., 2013). Não há relato na literatura sobre o potencial antiviral desse gênero, entretanto, o draft de 3 genomas de bactérias pertencentes a este gênero, as quais foram isoladas de esponjas do continente Antártico, estão presentes genes relacionados atividade antimicrobiana contra a *Burkholderia cepacia* (Fondi, et al., 2013). Frente a pouca informação sobre seu potencial biotecnológico este gênero foi selecionado para investigar se os isolados representantes desse gênero produzem compostos bioativos para a inibição do herpes vírus simplex tipo 1 e do vírus BVDV.

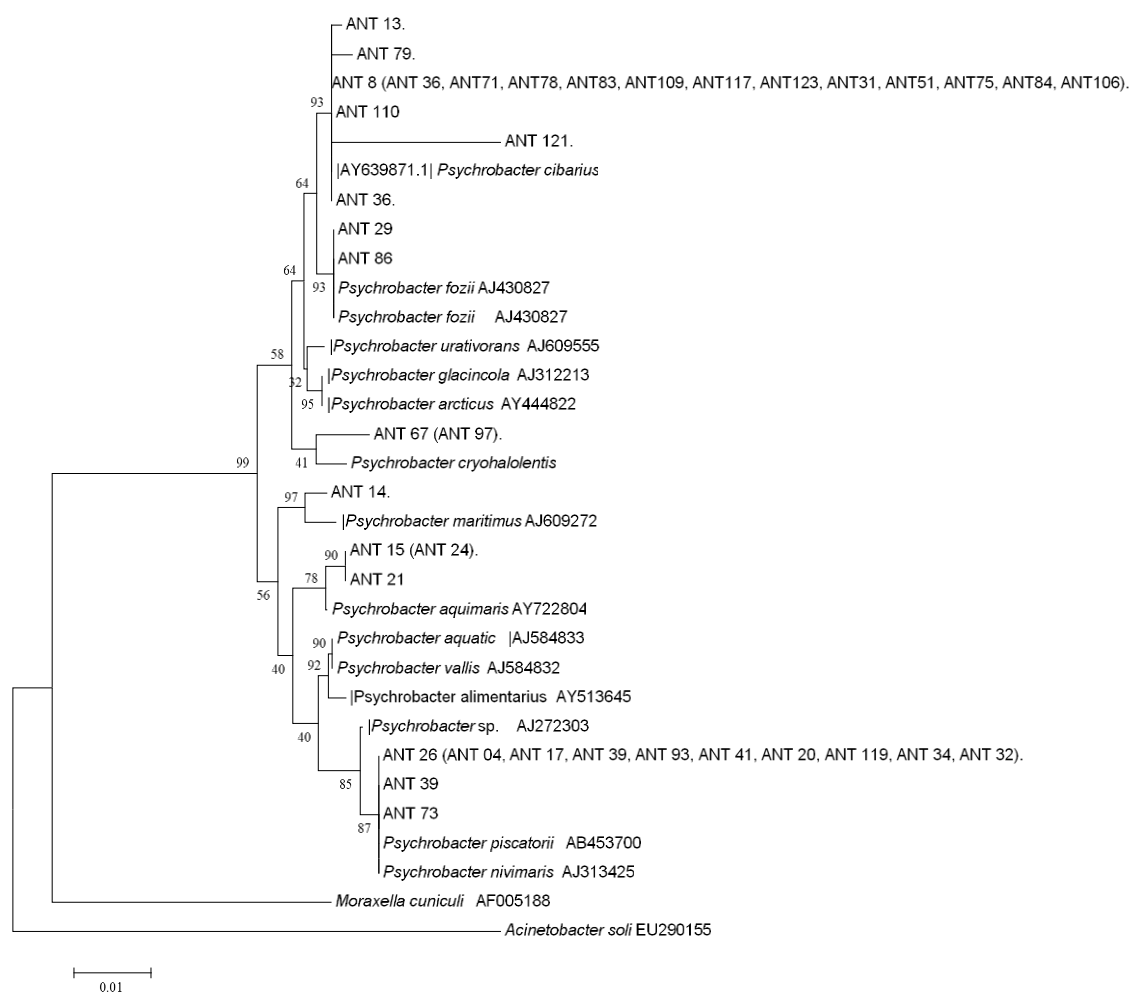


Figura 6. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Psychrobacter* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

5.1.3.1 Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae, ordem Pseudomonales, classe Gammaproteobacteria. São bactérias Gram-negativas e bacilares (Migula, 1984). Esse gênero é frequentemente encontrado em diversos tipos de ambientes.

A análise filogenética (Figura 7) permitiu a identificação de 16 isolados em nível de espécie. O isolado ANT 96 foi identificado como *Pseudomonas pachastrellae*. Essa espécie foi isolada de uma esponja marinha *Pachastrella* sp., coletada em 1991 do mar Philippiner a 750 metros de profundidade (Romanenko, et al, 2005). Os outros isolados, ANT 140 e ANT 152 agrupou com as espécies *Pseudomonas antarctica* e *Pseudomonas meridiana*. Os demais isolados, ANT 05, ANT 07, ANT 54, ANT 102 e ANT 113, provavelmente são a mesma espécie e agrupam com as espécies *P. marincola* e *P. segetis*. Esses isolados agrupam com diferentes espécies de *Pseudomonas* e somente uma análise polifásica revelaria com mais acurácia a identificação em nível de espécie.

Os isolados ANT 141, ANT 143, ANT 145, ANT 146, ANT 149 e ANT 150 foram identificados como *Pseudomonas azotoformans*. Essa espécie foi isolada por Iizuka e Komagata (1963). Até o presente momento essa espécie não é conhecida por produzir compostos de interesse farmacológicos.

Os isolados ANT 89, ANT 144, ANT 151, ANT 153 agruparam com as espécies *Pseudomonas trivialis*, *Pseudomonas poae* e *Pseudomonas lurida*, não sendo possível a identificação em nível de espécie desse isolado.

O gênero *Pseudomonas* apresenta espécies patogênicas que podem causar prejuízos à saúde humana, por outro lado, representantes deste gênero produzem biossurfactantes, expolissacarídeos, alguns compostos antimicrobianos e até mesmo produção de polissacarídeos com potencial antiviral (Matsuda, 1988). Neste sentido, isolados pertencentes a este gênero foram selecionados neste estudo para produção de extratos brutos e ensaio de atividade antiviral.

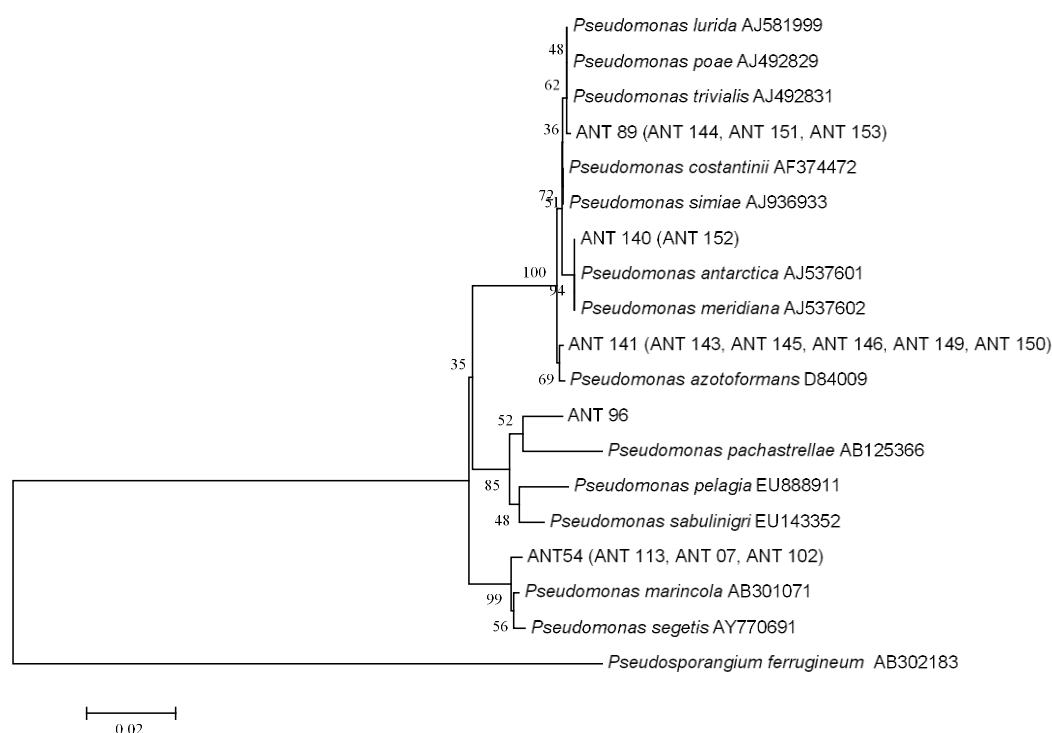


Figura 7. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

5.1.3.1 Gênero *Planococcus*

O gênero *Planococcus* pertence à família *Planococcaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Fimibacteria*. As espécies são cocos Gram positivas e aeróbicas (Migula, 1894). Esse gênero é conhecido pela produção de pigmentos, compostos com propriedades antimicrobianas, produção de biosurfactantes, bioemulsificantes e produção de expolissacarídeos (Satpute, et al., 2010), porém não há relatos sobre a atividade antiviral dos seus membros.

Os isolados pertencentes a este gênero foram analisados filogeneticamente (Figura 8). Os isolados ANT 12, ANT 33, ANT 35, ANT 55, ANT 56, ANT 63, ANT 82, ANT 112 e ANT 114 são possivelmente a mesma espécie, porém não foi possível a identificação em nível de espécie. Entretanto, o isolado ANT 19 foi identificado como *Planococcus rifitiensis* e o ANT 61 como *Planococcus maritimus*.

A espécie *Planococcus rifietoensis* foi isolada de uma alga em Campania, Itália e descrita por Romano e colaboradores em 2003. Membros desta espécie são produtores de proteases em diferentes condições de pH (Dang, et al., 2009) e, portanto, podem ser utilizados em diversos segmentos da indústria.

Planococcus maritimus foi isolada da água do mar na Coréia, descrita por Yoon, J.H. et al., (2003). Essa espécie ainda é pouco estudada e, até o presente momento, não há registros sobre o seu potencial biotecnológico.

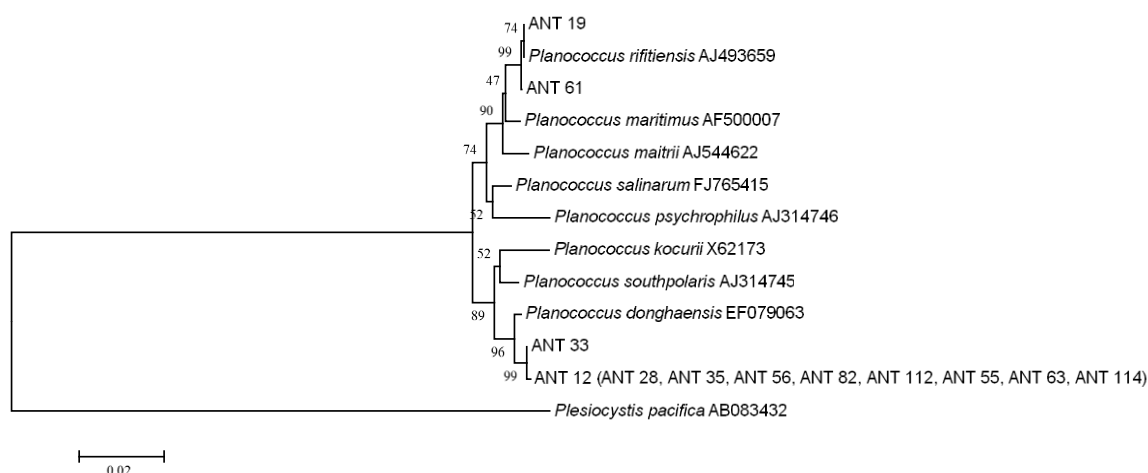


Figura 8. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Planococcus* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

5.1.3.4 Gênero *Brevibacterium*, *Salinibacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e *Kocuria*

Membros do gênero *Brevibacterium* pertencem à Família Brevibacteriaceae, Ordem Actinomycetales, Classe Actinobacteria. São bactérias Gram-positivas, frequentemente encontrada em solos, descrita por Breed em 1953. Esse gênero é conhecido pela sua utilização no processo de fermentação de alguns alimentos.

Neste estudo foram recuperados dois isolados de *Brevibacterium* a partir de sedimento marinho (Tabela 1), os quais foram selecionados para avaliação da atividade

anti-herpética porque pertence a uma classe de micro-organismos que ocorre a maior incidência de produção de compostos naturais com aplicações farmacêuticas.

Pela análise filogenética do gênero (Figura 9) mostrou que os dois isolados são provavelmente a mesma espécie e foram identificados como *Brevibacterium lutescens*. Essa espécie foi identificada por Wauters et al., (2003), isolada de amostras humanas (fluido peritoneal e líquido de infecção auricular) e também na preparação de peptona. Conhecimentos aprofundados a respeito dessa espécie ainda são escassos na literatura e não há evidências sobre as possíveis aplicações biotecnológicas, inclusive com interesse farmacológico.

Salinibacterium é um gênero da Família *Microbacteriaceae*; Ordem *Actinomycetales*; Classe *Actinobacteria*. São bactérias gram-positivas, aeróbicas, não formadora de esporos e geralmente encontradas em amostras de água do mar e de solos congelados (Shin et al., 2012).

Descrito por Han et al., em 2003, esse é um gênero novo e as informações sobre o potencial de bioprospecção de suas espécies são poucas. Não há evidência alguma sobre a capacidade de produzirem metabólitos secundários com propriedades farmacêuticas. Apesar disso, sua classe é uma das maiores representantes de produtos naturais com propriedades farmacêuticas derivados de micro-organismos e por isso foram produzidos extratos microbianos para os ensaios antivirais.

Na Figura 9 é possível observar a identificação taxonômica dos isolados ANT 122, ANT 90 e ANT 85. Os isolados provavelmente são da mesma espécie e pela análise filogenética eles foram identificados como *Salinibacterium amurskyense*.

Apenas um isolado, ANT 80, da espécie *Arthrobacter kerguelensis* foi recuperada neste estudo (Figura 9). O gênero foi descrito em 1947 por Conn e Dimmick e pertence à Família *Microcaceae*, Ordem *Actinomycetales*, Classe *Actinomycetes*. São bactérias Gram positivas e frequentemente encontradas em solos. Atualmente foi realizada uma nova descoberta sobre um novo multidomínio da enzima xilanase derivada de um membro de *Arthrobacter sp.* (Zhou et al., 2015). Esta enzima tem diversas aplicações, dentre elas é capaz de conservar a biomassa e aumentar a qualidade dos alimentos, isso salienta a importância desse gênero para a bioprospecção em outros segmentos, além de atividades enzimáticas.

Apenas um isolado do gênero *Rhodococcus* foi identificado. Pela análise filogenética o isolado ANT 103 foi identificado como pertencente ao gênero

Rhodococcus, com similaridade com as espécies *Rhodococcus rhodnii* e *Rhodococcus nanhaeiensis*. Atualmente a aplicação biotecnológica descrita por esse gênero não traz nenhuma informação sobre o potencial antiviral.

Neste estudo apenas um isolado, ANT 59, foi identificado como pertencente à espécie *Kocuria palustris* (Figura 9). Este gênero descrito em 1995 por Stackbrandt e colaboradores. São bactérias Gram-positivas, da Família Micrococaceae, Ordem Actinomycetales, Classe Actinomycetes.

Apesar da baixa incidência desses gêneros e da pouca informação sobre produtos naturais derivados desses com aplicações farmacêuticas, optou-se por avaliá-los, por pertencerem ao grupo das actinobactérias, grupo conhecido como os mais promissores na produção de compostos ativos.

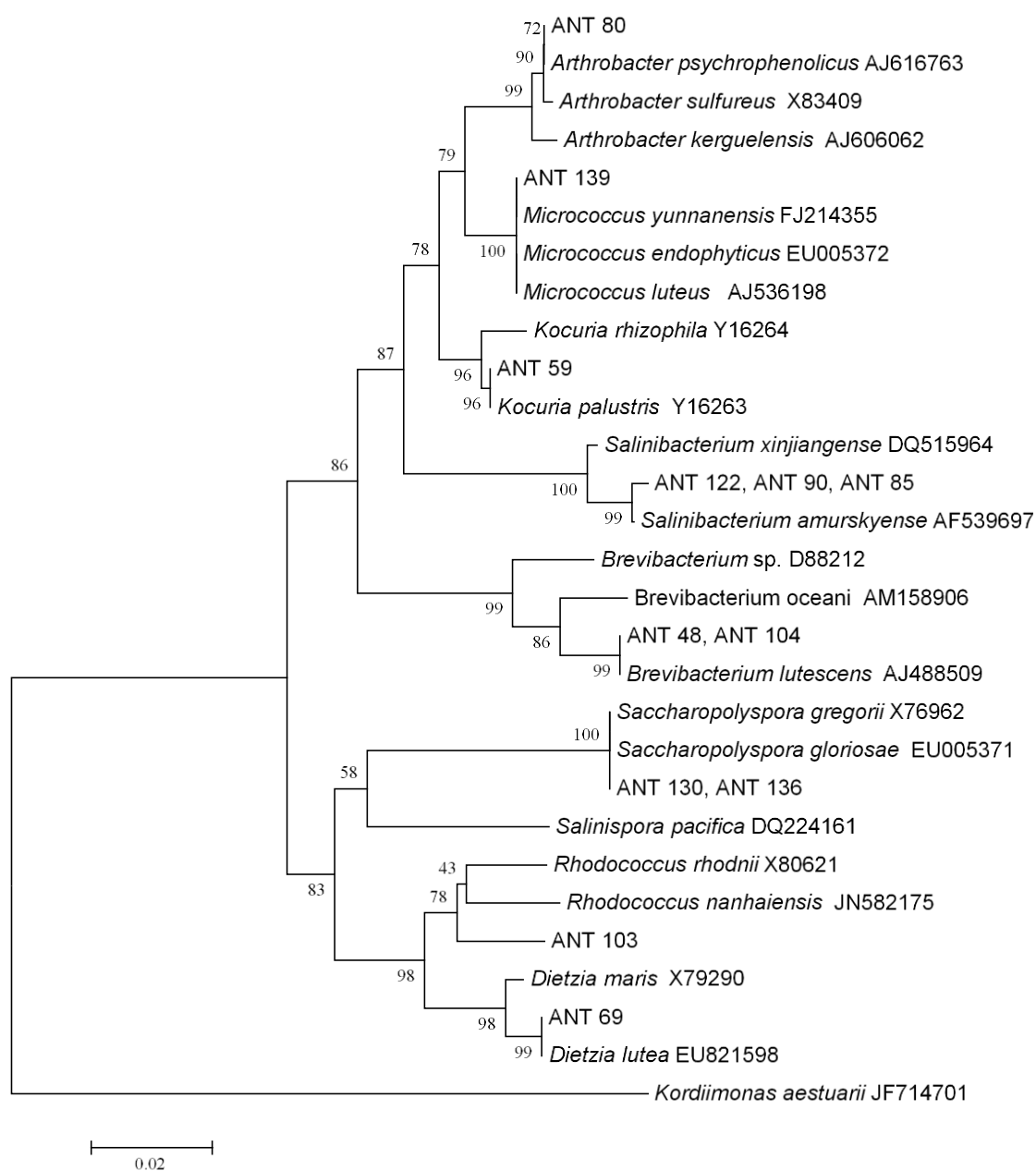


Figura 9. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos gêneros do Filo Actinobacteria isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

5.1.3.5 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito por Cohn em 1872, as bactérias são Gram-positivas, produtoras de endosporos, catalases e muitas enzimas de interesse industrial. Algumas espécies podem ser patogênicas e causam prejuízos para a saúde pública. Esse gênero

pertence à Família Bacillaceae, Ordem Bacillales, Classe Firmicutes. Na Figura 10 encontra-se a análise filogenética dos isolados desse trabalho.

De acordo com a Figura 10 o isolado ANT 125 e ANT 25 são o mesmo indivíduo, mas para confirmar isso será necessário utilizara técnica de T-RFLP que permite ter uma maior diferenciação entre ambos.

O isolado ANT 99 foi identificado como um *Bacillus* sp. Isso indica que é uma nova espécie de *Bacillus*.

Esse gênero não é muito conhecido pela produção de antivirais, mas pelo fato de produzirem metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas, o ANT 22 e ANT 99 foram selecionados para avaliação da atividade antiviral.

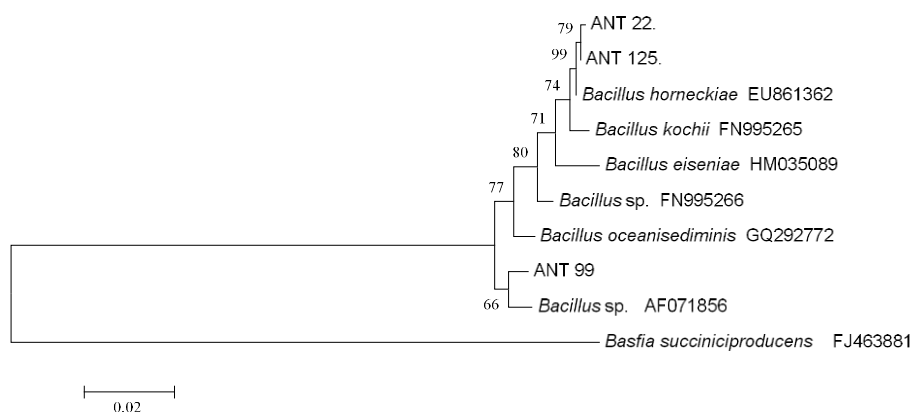


Figura 10. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

5.1.3.6 Gênero *Pseudoalteromonas*

Esse gênero foi descrito em 1995 por Guthier et al., (1995). As bactérias podem ser pigmentadas ou não pigmentadas, são Gram negativas e tipicamente associadas com hospedeiros eucariontes. Elas podem ser isoladas de organismos marinhos como esponjas, algas, tunicatos, mexilhões e também podem ser isolados de águas marinhas (Isnansetyo & Kanei, 2003).

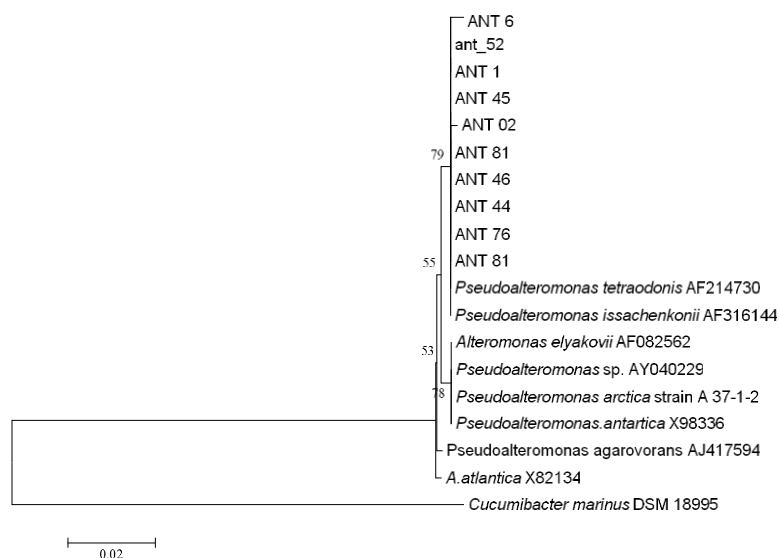


Figura 11. Árvore filogenética baseada em análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

Analisando a Figura 11, é possível que os isolados ANT 01, ANT 02, ANT 06, ANT 44, ANT 45, ANT 46, ANT 52, ANT 76 e ANT 81 sejam da mesma espécie e pela análise filogenética eles foram identificados entre *Pseudoalteromonas tetraodonis* e *Pseudoalteromonas issachenkonii*.

5.2 Ensaio antiviral

A seleção dos isolados para avaliação a atividade anti-herpética foi baseada, principalmente, na abundância do gênero no ambiente estudado e relatos da literatura demonstrando o potencial biotecnológico em outros ambientes. Assim, foram produzidos 22 extratos brutos (Tabela 2) a partir do crescimento bacteriano de diferentes isolados para avaliação da atividade antiviral frente ao vírus HSV tipo 1 na concentração de 50 ng/μL para cada extrato (Tabela 3). Através de observação por microscopia óptica foi possível avaliar o efeito citopático do vírus na célula (Figura 10).

Tabela 2. Relação do rendimento final, em grama, da fase orgânica obtida a partir da extração líquido-líquido de cada isolado microbiano.

Isolados	Peso do frasco (g)	Peso final (g)	Rendimento (g)
ANT 01	5,4281	5,4461	0,0180
ANT 08	5,4424	5,4526	0,0102
ANT 12	5,3483	5,3703	0,0220
ANT 15	11,1010	11,1190	0,0180
ANT 18	11,5288	11,5586	0,0298
ANT 19	5,4001	5,4227	0,0226
ANT 22	5,4332	5,4445	0,0113
ANT 26	5,4608	5,4704	0,0096
ANT 33	5,4202	5,4435	0,0233
ANT 36	5,4998	5,5102	0,0104
ANT 48	5,4489	5,4728	0,0239
ANT 54	5,4255	5,4451	0,0196
ANT 59	5,5380	5,5537	0,0157
ANT 80	5,4894	5,5024	0,0130
ANT 85	5,4055	5,4245	0,0190
ANT 90	5,4553	5,4656	0,0103
ANT 99	5,4135	5,4205	0,0070
ANT 103	5,5443	5,5701	0,0258
ANT 104	11,3879	11,4033	0,0154
ANT 122	11,2550	11,2784	0,0234
ANT 128	5,4247	5,4509	0,0262
ANT 130	5,4387	5,4603	0,0216
ANT 140	5,4511	5,4730	0,0219

Tabela 3. Avaliação da atividade anti-herpética frente ao vírus HSV tipo 1 dos extratos brutos obtidos dos isolados bacterianos.

Origem do isolado	Isolado	Gênero	^(a) TV	^(b) Atividade anti-herpética	^(c) PI (%)
Sedimento	ANT 01	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	5,5	5,5	0%
Sedimento	ANT 08	<i>Psychrobacter cibarius</i>	5,5	4,75	83%
Sedimento	ANT 12	<i>Planococcus donghaensis</i>	5,5	5,5	0%
Ascídia	ANT 15	<i>Psychrobacter aquimaris</i>	5,5	5,0	68%
Sedimento	ANT 18	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	5,5	5,5	0%
Sedimento	ANT 19	<i>Planococcus rifitiensis</i>	5,5	5,25	44%
Alga	ANT 22	<i>Bacillus</i> sp.	5,5	5,5	0
Esponja	ANT 26	<i>Psychrobacter</i> sp.	5,5	5,5	0
Sedimento	ANT 33	<i>Planococcus donghaensis</i>	4,25	4,25	0
Sedimento	ANT 36	<i>Psychrobacter cibarius</i>	5,5	4,75	83%
Sedimento	ANT 48	<i>Brevibacterium lutescens</i>	5,5	5,5	0
Sedimento	ANT 54	<i>Pseudomonas maricola</i>	5,5	5,25	44%
Sedimento	ANT 59	<i>Kocuria palustres</i>	5,5	5,0	68%
Sedimento	ANT 80	<i>Arthrobacter</i> sp.	5,5	4,5	90%
Sedimento	ANT 85	<i>Salinibacterium</i> sp.	5,5	5,5	0
Alga	ANT 90	<i>Salinibacterium</i> sp.	5,5	5,25	44%
Sedimento	ANT 99	<i>Bacillus</i> sp.	5,5	5,5	0%
Sedimento	ANT 103	<i>Rhococcus</i> sp.	5,5	5,25	44%
Sedimento	ANT 104	<i>Brevibacterium</i> sp.	5,5	4,5	90%
Alga	ANT 122	<i>Salinibacterium</i> sp.	5,5	5,0	68%
Alga	ANT 130	<i>Saccharopolyspora</i> sp.	5,5	5,25	44%
Líquen	ANT 140	<i>Pseudomonas</i> sp.	4,25	2	99%

^(a) TV: Titulação viral; ^(b) Atividade anti-herpética na concentração de 50 ng/ µl do extrato; ^(c) PI (%): Porcentagem de inibição do extrato.

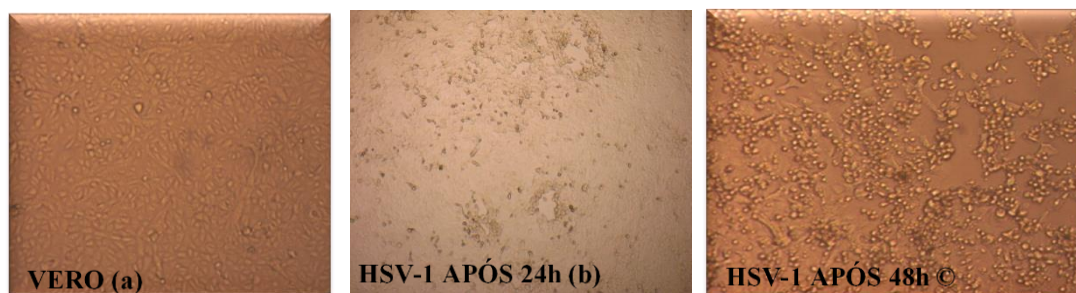


Figura 12. Observação em microscopia óptica do efeito citopático do vírus HSV-1 na célula VERO. (a) monocamada de células VERO formada após 24 horas de incubação com Meio Mínimo Eagle e 10% de soro fetal bovino. (b) monocada de células VERO com alguns efeitos citopáticos ocasionados pelo inóculo do vírus HSV-1 após 24 h de incubação. (c) monocada de células VERO com efeito citopático lesionando toda a monocamada celular após 48 h de incubação com o vírus HSV-1.

Como possível observar na Tabela 3 os extratos que apresentaram maior atividade de inibição viral foram: ANT 140 (99%), ANT 104 (90%), ANT 80 (90%). Esses extratos são oriundos de bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Brevibacterium* e *Arthrobacter*, respectivamente.

Do total de 22 extratos microbianos avaliados (Tabela 3), três extratos apresentaram resultados promissores. Após o ensaio de efeito citopático dos extratos foi realizado o índice de seletividade para avaliar se os compostos eram seguros para a célula.

Embora tenham sido avaliados seis isolados de *Psychrobacter*, apenas o extrato do isolado ANT 36 (*Psychrobacter cibarius*) apresentou maior Porcentagem de Inibição do vírus HSV-1, mas ainda assim não foi o suficiente para ser considerado um extrato ativo. Contudo esse resultado não elimina a possibilidade desse gênero produzir compostos *biologicamente* ativos, pois como descrito anteriormente, há relato na literatura sobre o draft do genoma de *Psychrobacter* evidenciando genes para a produção de antivirais.

Até o presente momento a atividade antiviral do gênero *Brevibacterium* e *Arthrobacter* não tem sido relatada. Esse estudo avaliou o potencial antiviral desses gêneros com a pretensão de produzir algum resultado inédito, porém esse fato não foi possível pois ambos os extratos microbinos oriundos desses gêneros apresentaram

índice de seletividade menor do que 4, e isso não é o suficiente para considerar o extrato como ativo.

Dentre esses quatro gêneros, *Pseudomonas* apresenta registros que evidenciam seu potencial de bom produtor de compostos antivirais. Isso pode explicar o excelente resultado do ensaio antiviral do extrato ANT 140, identificado como *Pseudomonas* sp., que apresentou 99% de inibição do HSV-1.

Em relação aos extratos que não apresentaram atividade anti-herpética, é possível que eles sejam gêneros que não produzem compostos com propriedades farmacêuticas ou as condições que foram submetidos não foram adequadas, pois algumas bactérias produzem compostos químicos quando crescem em ágar, mas quando em meio líquido perdem essa propriedade (Kanagasabhapathy, 2008).

Os extratos microbianos também foram testados contra o vírus BDVD e os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação da atividade antiviral do vírus BVDV dos extratos brutos obtidos dos isolados bacterianos.

Isolados	TV (Título Viral)	Ação dos Extratos (50 ng/μl)	Inibição %
ANT 01	4,75	4,5	44%
ANT 08	4,0	3,75	44%
ANT 12	4,0	3,5	68%
ANT 15	4,75	4,75	0%
ANT 18	4,75	4,75	0%
ANT 19	4,0	4,0	0%
ANT 22	4,0	3,5	68%
ANT 26	4,0	3,5	68%
ANT 36	4,5	4,5	0%
ANT 48	5,0	5,0	0
ANT 54	4,75	4,75	0%
ANT 59	4,75	4,75	0%
ANT 80	4,5	4,5	0%
ANT 85	5,5	5,5	0
ANT 90	4,75	4,5	44%
ANT 99	4,0	3,25	83%
ANT 103	4,75	4,75	0%
ANT 104	5,0	4,5	68%
ANT 122	5,0	4,5	68%
ANT 130	5,0	4,75	44%

Analisando a Tabela 4, foi possível observar que os 20 extratos microbianos produzidos não foram tão eficientes contra o vírus BVDV. A metade dos extratos não apresentou atividade antiviral (10 de 20 extratos testados). Cinco extratos apresentaram 68% e quatro apresentaram 44% de atividade antiviral. Apenas um extrato, ANT 99, apresentou atividade um pouco maior do que os outros extratos, com 83% de inibição, mas ainda assim foi considerado como um valor baixo e não foi possível considerá-lo como extrato ativo.

Quando se compara os resultados obtidos no ensaio antiviral para o HSV-1, Tabela 3, com os resultados do ensaio antiviral para o BDVD, Tabela 4, observa-se que os

extratos são mais eficientes para o Herpes Vírus Simplex tipo 1 do que para o BVDV. É interessante também observar que os resultados para alguns gêneros são diferentes e para outros não. Para o gênero *Bacillus*, representado pelo ANT 22 e ANT 99 na Tabela 3 os extratos não apresentam atividade antiviral, já na Tabela 4 apresentam os maiores valores obtidos, 68% e 83% de inibição, respectivamente.

Outras observações também podem ser feitas a respeito dos que apresentaram maiores valores para o teste BVDV do que para o HSV-1. O ANT 01, ANT 12 e ANT 26, são do gênero *Pseudoaltermonas*, *Planococcus* e *Psychrobacter*, respectivamente. Esses três isolados não apresentaram nenhuma inibição do vírus HSV-1, mas contra o vírus BVDV apresentaram, embora ainda não seja o suficiente para ser considerado ativo.

Os extratos microbianos testados contra o vírus BVDV não foram selecionados para calcular o índice de seletividade, pois somente os que apresentassem valores iguais ou acima de 90% seriam considerados ativos.

Ao comparar a Tabela 3 com a Tabela 4, conclui-se que os diferentes gêneros apresentam resultados diferentes. Isso deve ocorrer porque a especificidade do vírus HSV-1 é diferente do vírus BVDV, ou seja, as glicoproteínas do vírus HSV-1 e BVDV provavelmente são diferentes e apresentam receptores celulares diferentes que interagem com os compostos químicos dos extratos microbianos. As bactérias de diferentes gêneros, mesmo quando submetidas as mesmas condições ambientes, produzem metabólitos com propriedades químicas características que podem interagir nas diferentes fases de replicação viral. Essa interação pode ser influenciada por diversos fatores, mas no caso de cultura de célula o principal é a substância orgânica dos extratos, pois essa determina se a interação acontece na adsorção, penetração, replicação ou até mesmo a ausência de qualquer interação de proteção a célula.

5.2.3 Ensaio MTT e determinação do índice de seletividade (IS)

Os extratos ANT 80 e ANT 140 foram submetidos ao ensaio de MTT para obter a concentração de CC_{50} e IC_{50} . O valor da CC_{50} dos extratos ANT 80 e ANT 140 foi 19,05 e 159, respectivamente. O valor da IC_{50} dos extratos ANT 80 e ANT 140 foi 0,77 e 18, respectivamente.

Ao realizar a razão dos valores de CC_{50} por IC_{50} obtém-se o valor do índice de seletividade (IS). Sendo assim o IS do ANT 80 foi de 25,32 e do ANT 140 foi de 8,88.

Valores de IS maiores que 4 são indicativos que o composto apresenta segurança para as células, ou seja, atua no combate às infecções virais e não é nocivo para as células hospedeiras.

5.2.4 Mecanismo de ação do vírus HSV-1

Os extratos microbianos aplicados na cultura de células Vero infectadas com o vírus HSV-1 podem impedir a replicação do vírus inativando a partícula viral, impedindo que ocorra a adsorção viral nas células ou impedindo que o vírus consiga desenvolver os mecanismos de replicação do próprio genoma e síntese de enzimas e proteínas viral.

O extrato microbiano ANT 80 inativa a partícula viral, apenas com os experimentos realizados não é possível detalhar como exatamente essa inativação ocorre, mas é possível que substâncias químicas do extrato interaja com as glicoproteínas do envelope do vírus HSV-1, ou destrua a estrutura do envelope, impedindo a interação entre glicoproteínas e receptores celulares.

O extrato microbiano ANT 140 impede que ocorra a adsorção viral, pelo experimento realizado não foi possível definir como ocorre essa interação, mas provavelmente os compostos químicos do extrato interagem com os receptores celulares da célula Vero impedindo que esses se liguem as glicoproteínas do envelope viral do HSV-1. A primeira fase de replicação viral é a adsorção, quando o vírus não consegue se aderir a célula não é possível a evolução para as outras etapas e eles não se replica, ou seja, a célula está imunizada ao vírus.

6 CONCLUSÕES

Os 145 isolados de bactérias que foram identificados por sequenciamento 16SrRNA nesse estudo pertencem aos Filos Proteobacteria (67%), Firmicutes (21%), Actinobacteria (9%) e Bacteroidetes (3%), e foram classificados em 28 gêneros distintos. O gênero *Pyschrobacter* foi o mais abundante com 38 isolados obtidos a partir das amostras coletadas e analisadas. De acordo com a literatura, esses Filos e gêneros já foram anteriormente isolados do ambiente antártico.

As algas marinhas foram as amostras que apresentaram maior riqueza de espécies de bactérias isoladas, ou seja, apresentou a maior diversidade de gêneros identificados. Já a amostra coletada de sedimentos marinhos foi a que apresentou maior abundância, ou

seja, o maior número de isolados são provenientes dessas amostras, porém a diversidade de gêneros isolados é menor do que os oriundos das algas.

Os gêneros isolados que foram selecionados para produção dos 22 extratos microbianos submetidos aos ensaios antivirais foram *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Planococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium* e *Saccharopolyspora*.

Os isolados que apresentaram melhores resultados de inibição frente ao vírus Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) foram o ANT 80 e o ANT 140. O ANT 80 foi identificado como *Arthrobacter* sp. e o ANT 140 como *Pseudomonas* sp..

O extrato bruto obtido da linhagem ANT 80 apresentou 90% de inibição do vírus HSV-1 e índice de seletividade igual a 25,32. Até o presente momento na literatura não há relatos sobre compostos biologicamente ativos com potencial antiviral oriundos de bactérias do gênero *Arthrobacter*. Já o extrato bruto ANT 140 apresentou uma excelente atividade antiviral contra o HSV-1 com 99% de inibição do crescimento do vírus e índice de seletividade igual a 8,88. O gênero *Pseudomonas* apresenta espécies produtoras de compostos biologicamente ativos como antimicrobianos, anticâncer, antitumor, mais poucas são as informações sobre potenciais produtores antivirais, especialmente contra o vírus HSV-1.

O mecanismo de ação que o extrato ANT 80 age na inibição do desenvolvimento viral do HSV-1 é inativando o vírus, antes mesmo de conseguir se adsorver nas células hospedeiras. Já o extrato ANT 140 bloqueia a adsorção do vírus HSV-1 na célula hospedeira, ou seja, ele impede que o vírus HSV-1 se ligue aos receptores celulares específicos para penetração e replicação do vírus no interior da célula.

Os ensaios antivirais dos mesmos extratos não apresentaram resultados positivos quando testados contra o vírus Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). Não houve nenhum extrato microbiano que apresentou atividade de inibição maior que 90%, por isso todos foram considerados inativos para o vírus BVDV.

Os resultados apresentados evidenciam que o continente Antártico apresenta uma vasta diversidade bacteriana que necessita de mais estudos com a finalidade de buscar maior conhecimento sobre suas interações e importâncias ecológicas. Além disso, evidencia também que é de fundamental importância investigar o potencial de bioprospecção dessas bactérias, especialmente, como potenciais produtores de novos

compostos antivirais contra o vírus HSV-1, visto que esse estudo apresentou resultados otimistas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo trouxeram informações sobre a diversidade de bactérias oriundas de sedimentos e de macro-organismos da Ilha de Rei George, Baía de Almirantado, Antártica que condizem com outras já registradas, para o mesmo continente ou regiões com características geomorfológicas e climáticas semelhantes, em publicações científicas, mas também acrescentou novas informações e identificou a possibilidade de alguns isolados serem espécies novas.

Além disso, muitos gêneros identificados nesse estudo apresentam compostos bioativos com aplicações biotecnológicas diversas, inclusive aplicações farmacológicas. O interesse desse estudo foi específico em analisar atividade antiviral de alguns desses gêneros, mas outras aplicações podem ser avaliadas em projetos futuros, pois as informações obtidas sobre esses gêneros indicam que o potencial das bactérias oriundas da Antártica é diverso, merecendo destaque e investimento para pesquisas científicas nessa área, podendo gerar resultados inovadores.

Sobre as extrações dos extratos microbianos ressalta-se que as diversas condições extremas que estão submetidos os micro-organismos marinhos refletem na complexidade e variedade de metabólitos secundários produzidos, incluindo peptídeos com elevado potencial farmacêutico. Isso dificulta a padronização de protocolos de extração para obtenção de purificação dos compostos bioativos e exige a busca emergente por métodos cada vez mais eficientes.

Atualmente a prática mais utilizada para extração de compostos bioativos de micro-organismos é a extração orgânica. Esse método resulta em uma mistura complexa de compostos bioativos que posteriormente serão separados por fracionamento, purificados e caracterizados, usualmente, por técnicas cromatográficas. As técnicas cromatográficas são métodos de separação física dos compostos obtidos e proporcionam identificar o perfil químico das substâncias de interesse. Essas técnicas não foram aplicadas e testadas no extrato ANT 140 por motivo de indisponibilidade dos equipamentos necessários e de tempo para a execução. Porém isso não finaliza as investigações científicas desse extrato, visto que o grupo de pesquisa da Dra. Fabiana Fantinatti-

Garboggini dará continuidade aos estudos desse extrato com expressivo potencial de caracterizar um composto antiviral novo.

A avaliação do potencial anti-herpético contra o vírus HSV-1 apresentou o extrato ANT 140 como um excelente potencial inibidor do vírus, 99% de inibição e índice de seletividade (IS) de 8,88. O mecanismo de ação desse extrato é na adsorção do vírus, ou seja, ele impede que os vírus se acoplem na parede celular das células saudáveis, imunizando as células desse tipo de infecção viral.

Visto isso, fica evidente que a diversidade da comunidade microbiana das bactérias oriundas da Baía do Almirantado, Ilha de Rei George, Antártica é um recurso de relevante interesse para inovar a produção de novos compostos farmacológicos, inclusive na produção de compostos anti-herpéticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M. e Wagner, M. (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews*, 6: 431-440.
- Activities; affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 145(4): 553–581
- AISLABIE, Jackie M. et al., Bacterial composition of soils of the Lake Wellman area, Darwin Mountains, Antarctica. **Extremophiles**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.775-786, 3 jul. 2013.
- Al-Nahas, M O, et al., "Characterization of an exopolysaccharide-producing marine bacterium, isolate *Pseudoalteromonas* sp AM." *African journal of microbiology research* 5.22 (2011):3823-3831.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification & *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143– 169.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L. 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12): 1732-40.
- ARCHER, Stephen D. J. et al., Benthic microbial communities of coastal terrestrial and ice shelf Antarctic meltwater ponds. **Front. Microbiol.**, [s.l.], v. 6, p.1-11, 27 maio 2015.
- Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., Maugeri, T.L. (2009) An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology Letters*. 123:132-137
- Baginski, S.G.; Pevear, D.C.; Seipel, M.; Sun, S.C.; Benetatos, C.A.; Chunduru, S.K.; Rice, C.M.; Collett, M.S. 2000. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7981-7986.
- Baltz, H. R. (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes *Current Opinion in Pharmacol.*, 8: 557–563.
- Barbeyron, T., L'haridon, S., Corre, E., Kloareg, B., Potin, P. (2001). *Zobelliagalactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 985-997.
- Bastos, J. C. S., Kohn, L. K., Garboggini, F. F., Padilla, M. A., Flores, E. F., Silva, B. P., Menezes, C. B. A., Arns, C. W. (2013). Antiviral Activity of *Bacillus* sp. Isolated from the Marine Sponge *Petromica citrina* against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. *Viruses*, 5, 1219-1230.
- BASTOS, Juliana et al., Antiviral Activity of *Bacillus* sp. Isolated from the Marine Sponge *Petromica citrina* against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. **Viruses**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1219-1230, 29 abr. 2013. MDPI AG. DOI: 10.3390/v5051219.
- Bérdy, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *J. Antibiot.* 58(1): 1–26.
- Bianchi, B.R. 'ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE ISOLADOS DE ORGANISMOS MARINHOS'. 2012. 87. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, Campinas.
- BOCKHEIM, J.g. et al., Distribution of soil taxa in Antarctica: A preliminary analysis. **Geoderma**, [s.l.], v. 245-246, n. 6, p.104-111, maio 2015. Elsevier BV.
- Bowman, J. P., Mancuso, N. C., Gibson, J. A. E. (2003). *Algoriphagus ratkovskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov.

- and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**:1343-1355.
- Bowman, J.P., Nichols, D.S., McMeekin, T.A. (1997) *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a Halotolerant, Psychrophilic Bacterium Isolated from Antarctic Sea Ice. [Systematic and Applied Microbiology v. 20, n. 2](#), p. 209–215
- Bowman, J.P.; Cavanagh, J.; Austin, J.J.; Sanderson, K. (1996) Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 841-848.
- Bradner, J.R., Antarctic Microfungi as a Potential Bioresource. Julho de 2003. 186. Tese de PhD. Macquarie University Biotechnology Research Institute Sydney, New South Wales, Australia
- Brown, M. V. e Bowman, J. P. (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol.* 35: 267–275..
- Burja, A.M., Webster, N., Murphy, P. e Hill, R.T. (1999) Microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Qld. Mus.* 44: 63–75.
- Cerrano, C., Calcinai, B., Cucchiari, E., Camillo, E.D., Totti, C. e Bavestrello, G. (2004) The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae). *Polar Biol.*, 27: 231–237.
- Cheung, R. C. F., Hong, J. H., Pan, W. L., Chan, Y. S., Yin, C. M., et al., (2014). Antifungal and antiviral products of marine organisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 3475-3494.
- Christensen, H., Angen, Ø., Mutters, R., Olsen, J. E. & Bisgaard, M. (2000). DNA–DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. *Int J Syst Evol Microbiol* . 50:1095–1102.
- Chun J. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. Ph. D. Thesis- Department of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England, 1995.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada – 2ª. Edição, Norma M27-A2, 2002, vol.22, nº. 15.
- Curtze-Loveland, J., Miteva, V.I., Brenchley, J.E. (2011). Evaluation of new fluorimetric DNA–DNA hybridization method. *Can. J. Microbiol.* 57:250-255.
- Dezengrini R, Weiss M, Torres FD, Oliveira MS, Furian F, Mello CF, *et al.*, 2009. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J Neurovirol* 15: 153-163.
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. e Dohren, H. (2005) Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDITOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:539–548.
- Donio, MBS., Ronica, SFA., Viji, V. T., Velmurugan, S., Jenifer, J. A., Michaelbabu, M., Citarasu, M. (2013). Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 876-883.
- DOSHIDA, Junko et al., Exophilin A, a New Antibiotic from a Marine Microorganism *Exophiala pisciphila*. **J. Antibiot.**, [s.l.], v. 49, n. 11, p.1105-1109, 1996. Japan Antibiotics Research Association. DOI: 10.7164/antibiotics.49.1105.
- EIGEMANN, Falk et al., Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community. **Fems Microbiol Ecol**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.650-663, 24 out. 2012. Oxford University Press (OUP).

- ENGEL, J.a et al., Neonatal herpes simplex virus type 1 brain infection affects the development of sensorimotor gating in rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 863, n. 1-2, p.233-240, abr. 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0006-8993(00)02149-1
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic aciddeoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* . 39:224–229.
- Faulkner J. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2002;19:1–48.
- Felsenstein, J. (1995) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791. 21
- Flores, E. F., Weiblein. R., et al., (2005). A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25(3):125-134
- Fondi, M., Orlandini, V., Perrin, E., Maida, E., Bosi, E., Papaleo, M. C., et al., (2014). Draft genomes of three Antarctic *Psychrobacter* strain producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens. *Marine Genomes* **13**: 37-38.
- Friedrich, A.B., Merkert H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. e Hentschel, U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.* 134: 461-470.
- Galaup, P., et al., (2015). First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *Internatinal Journal of Dairy Techonology* 68: 144-147.
- Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Natarajaseenivasan, K. (2008) Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J. Mycologie Médicale*, 18: 16-22.
- Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Natarajaseenivasan, K. (2008) Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J. Mycologie Médicale*, 18: 16-22.
- GE, Shimei et al., Bioremediation of hexavalent chromate using permeabilized *Brevibacterium* sp. and *Stenotrophomonas* sp. cells. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 157, p.54-59, jul. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.04.011.
- GILES, Emily C. et al., Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. **Fems Microbiol Ecol**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.232-241, 4 set. 2012. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01467.x.
- Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile K., Bertrand H., Vogel T.M., Perriere, G., Simonet, P., Nalin, R.(2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5522– 5527.
- Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile K., Bertrand H., Vogel T.M., Perriere, G., Simonet, P., Nalin, R.(2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5522– 5527.
- GONCALVES, J. Antiviral effect of flavonoid-rich extracts of (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.477-480, 2001. Elsevier BV. DOI: 10.1078/s0944-7113(04)70069-0.

- Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2002) A fluorimetric method for the estimation of G + C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environmental Microbiology*. 4:770-773
- GUGLIELMIN, Mauro. Advances in permafrost and periglacial research in Antarctica: A review. **Geomorphology**, [s.l.], v. 155-156, p.1-6, jun. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.geomorph.2011.12.008.
- GUPTA, P.. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 6, p.2375-2378, 1 nov. 2004. Microbiology Society. DOI: 10.1099/ijs.0.63110-0.
- GUPTA, Puja et al., Bacterial diversity of Drass, cold desert in Western Himalaya, and its comparison with Antarctic and Arctic. **Arch Microbiol**, [s.l.], v. 197, n. 6, p.851-860, 9 jun. 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00203-015-1121-4.
- Haefner B: (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*, 8:536-544.
- halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. *Syst. Appl. Microbiol.*,
- HARDEN, Emma A. et al., Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.282-289, set. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.007.
- HASSAN, Sherif T. S.; MASARČÍKOVÁ, Radka; BERCHOVÁ, Kateřina. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. **J Pharm Pharmacol**, [s.l.], v. 67, n. 10, p.1325-1336, 9 jun. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/jphp.12436.
- He, L., Li, W., Huang. Y., Wang, L., Liu, Z., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005) *Streptomyces jietaisiensis* sp. Nov., isolated from soil in northern China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:1939-1944. Honeycutt *et al.*, 1995.)
- Hinsa-Leasure, S. M., Koid, C., Tiedje, J. M., Schultzhause, J. N. (2013). Biofilm formation by *Psychrobacter articus* and the role of a large adhesin in attachment to surface. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 3967-3973.
- HOGUE, Ian et al., Fluorescent Protein Approaches in Alpha Herpesvirus Research. **Viruses**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.5933-5961, 19 nov. 2015. MDPI AG. DOI: 10.3390/v7112915
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., Yasamoto, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**: 711-720.
- ISNANSETYO, A.. *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* substances. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.583-588, 1 mar. 2003. Microbiology Society. DOI: 10.1099/ijs.0.02431-0.
- JAMES, Scott H.; KIMBERLIN, David W.. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.391-400, set. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.idc.2015.05.001.
- JUNG, S.-y.. *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.577-582, 1 mar. 2005. Microbiology Society.
- KANAGASABHAPATHY, Manmadhan; SASAKI, Hideaki; NAGATA, Shinichi. Phylogenetic identification of epibiotic bacteria possessing antimicrobial activities isolated from red algal species of Japan. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.2315-2321, 23 abr. 2008. Springer Science + Business Media

- KIM, Han-woo et al., Cold adaptation of a psychrophilic chaperonin from *Psychrobacter* sp. and its application for heterologous protein expression. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 37, n. 9, p.1887-1893, 24 maio 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10529-015-1860-y.
- KIM, Mi-kyeong. Antibacterial Properties Associated with Microorganisms Isolated from Arctic Lichens. **Korean J. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.380-388, 28 dez. 2012. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. DOI: 10.4014/kjmb.1207.07028
- KIM, Ok-sun et al., Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. **Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 6, p.1081-1085, dez. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s12275-012-2655-7.
- KIM, S.-j. et al., *Shewanella arctica* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from Arctic marine sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 5, p.1128-1133, 1 jul. 2011. Microbiology Society. DOI: 10.1099/ij.s.0.031401-0.
- Kim, T. K., Garson, M.J. e Fuerst, J.A. (2005) Marine actinomycetes related to the “*Salinospora*” group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.* 7: 509–518.
- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kondakova, A. N., et al., (2012). Structure of an acidic polysaccharide isolated from *Psychrobacter maritimus* 3pS containing a bacillosamine derivative. *Carbohydrate Research* 359: 7–10.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. e Pace, N.R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 6955-6959.
- Lee, W., Lee, S. H., Ahn, D. G., Cho, H., Sung, M. H., Han, S. H., Oh, J. W. (2014). The antiviral activity of poly-γ glutaminic acid, a polypeptide secreted by *Bacillus* sp., through induction of CD14-dependent type 1 interferon responses. *Biomaterials* 34: 9700-9708.
- LEE, Yung Mi et al., Bacterial community of sediments from the Australian-Antarctic ridge. **Polar Biol**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.587-593, 27 fev. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00300-014-1467-0.
- LOPANIK, Nicole B.. Chemical defensive symbioses in the marine environment. **Functional Ecology**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.328-340, 30 ago. 2013. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/1365-2435.12160.
- Lorenz, R.J. & Bögel, K. Methods of calculation. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKY, H. (Eds). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization; 1973. App.I, p.321-335
- Loveland-Curtze J., Miteva, V.I., Brenchley, J.E. (2011) Evaluation of a new fluorimetric DNA-DNA hybridization method. *Can. J. Microbiol.* 57: 250–255
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2004) *Microbiologia de Brock*. São Paulo. Pearson Prentice Hall. 10º ed. p. 302-336. 584.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2004) *Microbiologia de Brock*. São Paulo. Pearson Prentice Hall. 10º ed. p. 302-336. 584.
- Manivasagan, M., Kang, K. H., Sivakumar, K., Li-Chan, E. C. Y., Oh, H. M., Kim, S. K. (2014). Marine Actinobacteria: An important source for bioactive natural products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 38, n. 1, p.172-188.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S. K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research* 169: 262-278.

- Margesin, R., Miteva, V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganism. *Research in Microbiology*, 162:346-361.
- Margesin, R., Schiner, F. (1994) Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 33:1-14
- MARGESIN, Rosa; MITEVA, Vanya. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 162, n. 3, p.346-361, abr. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.12.004.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its denaturation temperature. *J Mol Biol* . 5:109–118.
- Matsuda, M., Shigeta, S., Okutani, K. (1999). Antiviral Activities of Marine Pseudomonas Polysaccharides and Their Oversulfated Derivatives. *Marine Biotechnology* 1, 68-73.
- MAYER, Alejandro et al., Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.2510-2573, 16 jul. 2013. MDPI AG. DOI: 10.3390/md11072510.
- MAYER, Alejandro M. S.; HAMANN, Mark T.. Marine Pharmacology in 2000: Marine Compounds with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Cardiovascular, Immune, and Nervous Systems and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Biotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.37-52, 1 fev. 2004. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10126-003-0007-7
- MAYER, Alejandro M.s. et al., Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 145, n. 4, p.553-581, maio 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.01.015.
- Meyer, A.M.S., Rodriguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamman, M.T. (2007) Marine pharmacology in 2003-4: Marine Compounds with Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Antiinflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral
- Meyer, B. e Kuever, V. (2008) Phylogenetic Diversity and Spatial Distribution of the Microbial Community Associated with the Caribbean Deep-water Sponge *Polymastia cf. corticata* by 16S rRNA, *aprA*, and *amoA* Gene Analysis. *Microb. Ecol.*, 56:306–321.
- MUSCHOLL-SILBERHORN, Albrecht; THIEL, Vera; IMHOFF, Johannes F.. Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.94-106, 13 maio 2007. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00248-007-9255-9.
- NEWCOMER, Benjamin W. et al., Efficacy of an antiviral compound to inhibit replication of multiple pestivirus species. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.127-129, nov. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.09.005.
- NEWCOMER, Benjamin W. et al., Efficacy of an antiviral compound to inhibit replication of multiple pestivirus species. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.127-129, nov. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.09.005.
- NEWCOMER, Benjamin W.; GIVENS, M. Daniel. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.133-150, out. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.07.015.

- NEWCOMER, Benjamin W.; GIVENS, M. Daniel. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.133-150, out. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.07.015
- Novais, C.M., Alves, M.P., Silva, F.F. (2004) PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento*, 33:10-13.
- PAN, Qi et al., Denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting of soil bacteria in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. **Journal Of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1649-1655, ago. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s1001-0742(12)60229-0.
- PAPALEO, Maria Cristiana et al., Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.824-838, set. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.03.011.
- PENESYAN, Anahit et al., Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.113-124, jul. 2009. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00688.x.
- Pinto, A. M.V., Leite, J. P.G., et al., (2012). Marine natural seaweed products as potential antiviral drugs against Bovine viral diarrhea virus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Vol 22 nº 4 p. 813-817.
- Pospiech A.; Neumann B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genetics*, 11(6): 217-218.
- Raaijmakers, J. M., Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34: 1037–1062.
- RAMPELOTTO, Pabulo Henrique et al., Distribution and Interaction Patterns of Bacterial Communities in an Ornithogenic Soil of Seymour Island, Antarctica. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.684-694, 24 out. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00248-014-0510-6.
- RASHID, Zalilawati Mat et al., Isolation of a sulphated polysaccharide from a recently discovered sponge species (*Celtodoryx girardae*) and determination of its anti-herpetic activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.286-293, abr. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.01.002.
- RIDPATH, Julia F.. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.14-19, jan. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biologicals.2012.07.003.
- Romanenko, L. A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G. M., Zhukova, N. V., Mikhailov, V. V. (2005). *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 919–924.
- ROMANENKO, Lyudmila A. et al., Antimicrobial potential of deep surface sediment associated bacteria from the Sea of Japan. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1169-1177, 6 fev. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11274-013-1276-6.
- RUPPERT, E.E., FOX, R.S. & BARNES, R.D. 2005. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed., Ed. Roca, São Paulo, 1145 p
- Sagar, S., Kauer, M., Minneman, K.P. (2010) Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges.
- Saitou, N. e Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.

- Salomon, C.E., Magarvey, N.A. e Sherman, D.H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 21:105–121.
- SANTOS, Anderson F. et al., Detection of proteases from *Sporosarcina aquimarina* and *Algoriphagus antarcticus* isolated from Antarctic soil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 87, n. 1, p.109-119, 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/0001-3765201520130519.
- SCHUETT, Christian et al., Diversity of intratunical bacteria in the tunic matrix of the colonial ascidian *Diplosoma migrans*. **Helgoland Marine Research**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.136-140, 8 fev. 2005. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10152-004-0212-4.
- Sfanos, K., Harmody, D., Dang, P., Ledger, A., Pomponi, S., McCarthy, P. e Lopez, J. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic & Applied Microbiology*. 28: 242–264.
- Shin, C. S., et al., (2012). Genome Sequence of a *Salinibacterium* sp. Isolated from Antarctic Soil. *Journal of Bacteriology* p. 2404.
- Silva, D. C., et al., (2014). Antiviral activity of a *Bacillus* sp. P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. *Brazilian Journal of Microbiology* 45,3, 1089-1094.
- SINGH, Ravindra Pal; KUMARI, Puja; REDDY, C. R. K.. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.1571-1586, 31 dez. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-014-6334-y.
- Srinivas, T. N. R., et al., (2009). Bacterial Diversity and Bioprospecting for Cold-Active Lipases, Amylases and Proteases, from Culturable Bacteria of Kongsfjorden and Ny-A°lesund, Svalbard, Arctic. *Curr Microbiology* 59:537-547.
- STAIKOV, Ivan N. et al., Is herpes simplex a systemic disease? **Clinics In Dermatology**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.551-555, set. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2015.05.007
- Stokes, J.L. (1963) General biology and nomenclature of psychrophilic bacteria. In: Gibbons, N.E. (ED), *Recent Progress in Microbiology*, vol III. University of Toronto Press, Toronto, pp. 187-192
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D. e Wagner, M. (2007) Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology And Molecular Biology Reviews.*, 71 (2): 295–347.
- THIRUMURUGAN, D.; VIJAYAKUMAR, R.. Characterization and Structure Elucidation of Antibacterial Compound of *Streptomyces* sp. ECR77 Isolated from East Coast of India. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 5, p.745-755, 6 fev. 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00284-015-0780-3.
- Thomas, D. N.; Fogg, G. E.; Convey, P.; Fritsen, C.H.; Gili, J. M.; Gradinger, R.; Laybourn-Parry, J.; Reid, K.; Walton. D. W. H. (2008) The biology of polar regions. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Thompson, J.D., Higgins D.J. e Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties & weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- TONG, Jing et al., Antiviral Activities and Putative Identification of Compounds in Microbial Extracts from the Hawaiian Coastal Waters. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.521-538, 24 fev. 2012. MDPI AG. DOI: 10.3390/md10030521.
- UGOLINI, F.c.; BOCKHEIM, J.g.. Antarctic soils and soil formation in a changing environment: A review. **Geoderma**, [s.l.], v. 144, n. 1-2, p.1-8, mar. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.geoderma.2007.10.005.

- URIA, Agustinus; PIEL, Jörn. Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. **Phytochem Rev**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.401-414, 4 abr. 2009. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11101-009-9127-7.
- VAN TRAPPEN, S.. *Algoriphagus antarcticus* sp. nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 6, p.1969-1973, 1 nov. 2004. Microbiology Society. DOI: 10.1099/ijs.0.02973-0.
- Vignesh, S., Raja, A., James, R.A. (2011) Marine Drugs: Implication and Future Studies. *International Journal of Pharmacology*. 7 (1):22-30.
- Vignesh, S., Raja, A., James, R.A. (2011) Marine Drugs: Implication and Future Studies. *International Journal of Pharmacology*. 7 (1):22-30.
- WALL, Diana H.. Biodiversity and ecosystem functioning in terrestrial habitats of Antarctica. **Antarctic Science**, [s.l.], v. 17, n. 04, p.523-531, 18 nov. 2005. Cambridge University Press (CUP). DOI: 10.1017/s0954102005002944.
- WAUTERS, G.. *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.1321-1325, 1 set. 2003. Microbiology Society. DOI: 10.1099/ijs.0.02513-0.
- Webster, N.S. e Bourne, D. (2007) Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol*. 59: 81–94.
- Webster, N.S. e Hill, R.T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -proteobacterium. *Mar. Biol*. 138: 843–851.
- Webster, N.S., Negri, A.P., Munro, M.M., e Battershill, C.N. (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol*. 6: 288–300.
- Webster, N.S., Watts, J.E., e Hill, R.T. (2001) Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. *Mar. Biotechnol*. 3: 600– 608.
- Weiner, R.M. (1997) Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol*. 15:390–4.
- Weiner, R.M. (1997) Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol*. 15:390–4.
- Wu, G., W, G., Zhan, T., Shao, Z., Liu, Z. (2013). Characterization of a cold-adaptation and salt tolerant esterase of psychrotrophic bacterium *Psychrobacter pacificensis*. *Extremophiles* **17**: 809-819.
- XIAO, Xiang et al., Bacterial communities inside and in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, [s.l.], v. 19, n. 01, p.11-16, 28 fev. 2007. Cambridge University Press (CUP). DOI: 10.1017/s095410200700003x
- YAKOUB, Abraam M.; SHUKLA, Deepak. Herpes Simplex Virus-1 Fine-Tunes Host's Autophagic Response to Infection: A Comprehensive Analysis in Productive Infection Models. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.1-13, 20 abr. 2015. Public Library of Science (PLOS). DOI: 10.1371/journal.pone.0124646.
- Yoon, J. H., Lee, C. H., Kang, S. J., Oh, T. K. (2005). *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *IJSEM* vol. 55 no. 5 1885-1890.
- Yoon, J. H., Weiss, N., Kang, K. H., Oh, T. K., Park, Y. H. (2003). *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2013–2017.
- ZDANOWSKI, Marek K. et al., Culturable bacteria community development in postglacial soils of Ecology Glacier, King George Island, Antarctica. **Polar Biol**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.511-527, 25 dez. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00300-012-1278-0.

- ZENG, Yin-xin et al., Diversity of bacterioplankton in coastal seawaters of Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. **Arch Microbiol**, [s.l.], v. 196, n. 2, p.137-147, 10 jan. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00203-013-0950-2.
- Zhou, J., Shen, J., Zhang, R., Tang, X., Li, J., Xu, B., Ding, J., Gao, Y., Xu, D., Huang, Z. (2015). Molecular and Biochemical Characterization of a Novel Multidomain Xylanase from *Arthrobacter* sp. GN16 Isolated from the Feces of *Grus nigricollis*. *Appl Biochem Biotechnol* 175:573–588.

9 ANEXO

9.1 Anexo A

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Identificação de bactérias oriundas da Antártica e investigação do potencial antiviral"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de dezembro de 2015

Assinatura : Mariana B. P. Nery
Nome do(a) autor(a): **Mariana Bueno de Paula Nery**
RG n.º 43.705.898-0, SSP

Assinatura : Fabiana Fantinatti Garboggini
Nome do(a) orientador(a): **Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini**
RG n.º 16.973.966-1, SSP

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini
Divisão de Recursos Microbianos

9.2 Anexo B



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378, email: cpgibi@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**Identificação de bactérias oriundas da Antártica e investigação do potencial antiviral**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Mariana B. B. Nery
Nome do(a) aluno(a): Mariana Bueno de Paula Nery

Assinatura: Fabiana Fantinatti Garboggini
Nome do(a) orientador(a): Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Data: 14/12/2015

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini
Divisão de Recursos Microbianos
CPQBA - UNICAMP
CRB 31738/01-D